

# **Caracterización clínica y biológica de la neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica y comparación con su contrapartida celular normal**

María Lourdes Martín Martín

Directores:

Dr. Alberto Orfao

Dra. Julia Almeida

**TESIS DOCTORAL**

**2016**



**VNiVERSiDAD  
DSALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**800 AÑOS**

**1218 ~ 2018**



**D. Alberto Orfão de Matos Correia e Vale, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca**

**CERTIFICA:**

Que el trabajo doctoral realizado en formato de compendio de artículos/publicaciones bajo mi dirección por Dña. María Lourdes Martín Martín y titulado "Caracterización clínica y biológica de la neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica y comparación con su contrapartida celular normal", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca a 30 de marzo del año 2016.



**Fdo.: Dr. Alberto Orfão de Matos**



**Dña. Julia María Almeida Parra, Doctora en Medicina y Cirugía y Profesora Titular del  
Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca**

**CERTIFICA:**

Que el trabajo doctoral realizado en formato de compendio de artículos/publicaciones bajo mi dirección por Dña. María Lourdes Martín Martín y titulado "Caracterización clínica y biológica de la neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica y comparación con su contrapartida celular normal", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca a 30 de marzo del año 2016.



**Fdo.: Dra. Julia Almeida Parra**



La presente tesis doctoral incluye tres trabajos originales publicados en revistas científicas indexadas en *Science Citation Reports*, según se detalla a continuación:

**1. Immunophenotypical, morphologic, and functional characterization of maturation-associated plasmacytoid dendritic cell subsets in normal adult human bone marrow.**

Martín-Martín L<sup>1</sup>, Almeida J<sup>1</sup>, Hernández-Campo PM<sup>1</sup>, Sánchez ML<sup>1</sup>, Lécresse Q<sup>1</sup>, Orfao A<sup>1</sup>.

Transfusion. 2009 Aug; 49(8):1692-1708. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02170.x.

**2. Classification and clinical behavior of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms according to their maturation-associated immunophenotypic profile.**

Martín-Martín L<sup>1</sup>, López A<sup>1</sup>, Vidriales B<sup>2</sup>, Caballero MD<sup>2</sup>, Silva Rodrigues A<sup>3</sup>, Ferreira SI<sup>4</sup>, Lima M<sup>6</sup>, Almeida S<sup>6</sup>, Valverde B<sup>7</sup>, Martínez P<sup>8</sup>, Ferrer A<sup>9</sup>, Candeias J<sup>10</sup>, Ruíz-Cabello F<sup>11</sup>, Marco Buadesa J<sup>12</sup>, Sempere A<sup>13</sup>, Villamor N<sup>14</sup>, Orfao A<sup>1</sup>, Almeida J<sup>1</sup>.

Oncotarget. 2015 Aug; 6(22): 19204–19216. doi: 10.18632/oncotarget.4146

**3. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm frequently shows occult central nervous system involvement at diagnosis and benefits from intrathecal therapy.**

Martín-Martín L<sup>1</sup>, Almeida J<sup>1</sup>, Pomares H<sup>15</sup>, González-Barca E<sup>15</sup>, Bravo P<sup>16</sup>, Giménez T<sup>17</sup>, Heras C<sup>18</sup>, Queizán JA<sup>19</sup>, Pérez-Ceballos E<sup>20</sup>, Martínez V<sup>21</sup>, Alonso N<sup>22</sup>, Calvo C<sup>23</sup>, Álvarez R<sup>24</sup>, Caballero MD<sup>2</sup>, Orfao A<sup>1</sup>.

Oncotarget. 2016. doi: 10.18632/oncotarget.7101

<sup>1</sup>Servicio General de Citometría-NUCLEUS, Departamento de Medicina; Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL) e IBSAL, Universidad de Salamanca; <sup>2</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca (HUS) e IBSAL, Universidad de Salamanca; <sup>3</sup>Servicio de Hematología, Hospital de Santo António dos Capuchos, Lisboa, Portugal; <sup>4</sup>Laboratório Médico Santa Luzia, Florianópolis, SC, Brasil; <sup>5</sup>Servicio de Hematología Clínica, Hospital de Santo António, Porto, Portugal; <sup>6</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal; <sup>7</sup>Servicio de Hematología, Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, San José, Costa Rica; <sup>8</sup>Servicio de Hematología, Hospital 12 de Octubre, Madrid; <sup>9</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital del Mar, Barcelona; <sup>10</sup>Departamento de Inmunología, Hospital São João, Porto, Portugal; <sup>11</sup>Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada; <sup>12</sup>Servicio de Hematología, Hospital General de Castellón, Castellón; <sup>13</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario La Fé, Valencia; <sup>14</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clinic, Barcelona; <sup>15</sup>Servicio de Hematología, Institut Català d'Oncologia (ICO), Hospital Duran i Reynals, Universidad de Barcelona, Barcelona; <sup>16</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid; <sup>17</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Joan XXIII, Tarragona; <sup>18</sup>Servicio de Hematología, Hospital Infanta Leonor, Madrid; <sup>19</sup>Servicio de Hematología, Hospital of Segovia, Segovia; <sup>20</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia; <sup>21</sup>Servicio de Hematología, Hospital de León, León; <sup>22</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Santiago, Santiago de Compostela; <sup>23</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza; <sup>24</sup>Servicio de Hematología, Hospital General Yagüe, Burgos.





*A mis padres*  
*A mi hermana*



“El aprendizaje es experiencia, todo lo demás es información”

*Albert Einstein*



# Agradecimientos



# Índice

<b>Introducción.....</b>	<b>5</b>
1. Células dendríticas humanas .....	7
1.1. Características generales.....	7
1.2. Subpoblaciones de células dendríticas humanas .....	8
1.3. Origen y ontogenia de las células dendríticas .....	10
1.4. Funciones de las células dendríticas .....	13
1.4.1. Inducción de respuestas inmunogénicas.....	13
1.4.2. Inducción de tolerancia inmune.....	16
1.5. La célula dendrítica plasmocitoide.....	17
1.5.1. Características fenotípicas de la célula dendrítica plasmocitoide .....	18
1.5.2. Características funcionales de la célula dendrítica plasmocitoide .....	23
1.5.2.1 Respuesta anti-viral .....	23
1.5.2.2 Tolerancia inmune .....	29
2. Neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica.....	31
2.1. Características generales.....	33
2.2. Formas de presentación y características clínicas .....	35
2.3. Características fenotípicas.....	37
2.4. Características genéticas y moleculares.....	40
2.5. Tratamiento .....	43
2.5.1. Tratamiento actual de la NCDPB .....	43
2.5.2. Respuesta al tratamiento y supervivencia .....	44
2.5.3. Nuevos tratamientos dirigidos a la NCDPB .....	46
<b>Hipótesis de trabajo y objetivos .....</b>	<b>49</b>
<b>Materiales, métodos y resultados .....</b>	<b>55</b>
Artículo 1: “Caracterización fenotípica, morfológica y funcional de los estadios madurativos de la célula dendrítica plasmocitoide en médula ósea normal de adultos” .....	57
Artículo 2: “Clasificación y comportamiento clínico de la neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica de acuerdo con su perfil inmunofenotípico de maduración” .....	79
Artículo 3: “La neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica muestra con frecuencia infiltración del sistema nervioso central al diagnóstico, beneficiándose de la administración de tratamiento intratecal” .....	95
<b>Discusión .....</b>	<b>105</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>125</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>129</b>





# Glosario de abreviaturas

## a

**AraC:** citarabina (= arabinósido de citosina)

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ARN:** ácido ribonucleico

## b

**BDCA:** antígeno de célula dendrítica sanguínea (del inglés "*blood dendritic cell antigen*")

## C

**CD:** grupo o *cluster* de diferenciación (del inglés, "*cluster differentiation*")

**CD2AP:** proteína asociada a CD2 (del inglés "*CD2-associated protein*")

**CDc:** célula dendrítica clásica

**CDp:** célula dendrítica plasmocitoide

**CDs:** células dendríticas

**CFDA,SE:** diacetato de carboxifluoresceína, succinimidil éster

**CGH:** hibridación genómica comparada (del inglés, "*comparative genomic hybridization*")

**CLA:** antígeno cutáneo linfocitario (del inglés, "*cutaneous lymphocyte-associated antigen*")

**CMKLR1:** del inglés, "*chemerin chemokine-like receptor 1*"

**CMF:** citometría de flujo

**CPA:** célula presentadora de antígeno

**CpG-ODN:** oligodesoxinucleótidos CpG (del inglés, "*CpG oligodeoxynucleotides*")

**Cy:** citoplasmático (del inglés, "*cytoplasmic*")

## d

**DC-SIGN:** del inglés "dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing non-integrin"

## e

**EORTC:** Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (del inglés, "*European Organization for Research and Treatment of Cancer*")

## f

**FcR:** receptor para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas (del inglés, "*Fc receptor*")

**FLT:** tirosin quinasa similar a FMS (del inglés, "*FMS-like tyrosine kinase*")

## g

**GM-CSF:** factor estimulante de colonias granulo-monocíticas (del inglés "*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*")

## h

**HLA:** antígeno leucocitario humano (del inglés "*human leukocyte antigen*")

## i

**ICOSL:** ligando de la molécula coestimuladora inducible (del inglés, "*inducible T-cell co-stimulator ligand*")

**IDO:** indolamina 2,3-dioxigenasa

**IFN:** interferón

**Ig:** inmunoglobulina

**IL:** interleucina

**ILT:** del inglés "immunoglobulin-like transcript"

**ITAM:** motivo de activación de inmunorreceptores que señalizan por fosforilación de tirosinas (del inglés "*immunereceptor tyrosine-based activation motifs*")

**ITIM:** motivos de inhibición de inmunorreceptores que señalizan por fosforilación de tirosina (del inglés "*immunereceptor tyrosine-based inhibitory motifs*")

# I

**Lin:** línea celular

**LCR:** líquido cefalorraquídeo

**LDH:** lactato deshidrogenasa

**LLA:** leucemia linfoblástica aguda

**LMA:** leucemia mieloblástica aguda

**LNH:** linfoma no Hodgkin

# m

**MO:** médula ósea

**MON:** médula ósea normal

# n

**NCDPB:** neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés, "*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*")

**NG2:** antígeno neural/glial 2 (del inglés, "*neural/glial antigen 2*")

**NOD:** nucleótidos y dominios de oligomerización (del inglés "*nucleotide and oligomerization domains*")

**nTreg:** linfocitos T reguladores naturales

# O

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

# p

**PCD:** precursor de célula dendrítica

**PG:** prostaglandina

**Pre-CDp:** precursor de célula dendrítica plasmocitoide

# S

**SLAM:** molécula linfocitaria activadora de señales (del inglés, "*signaling lymphocytic activation molecule*")

**SMD:** síndrome mielodisplásico

**SNC:** sistema nervioso central

**SP:** sangre periférica



**TAPH:** trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos

**TCL1:** proteína 1 del linfoma/leucemia de linfocitos T (del inglés, "*T-cell leukemia/lymphoma protein 1*")

**TCR:** receptor de la célula T (del inglés "*T-cell receptor*")

**TdT:** deoxinucleotidil transferasa terminal (del inglés, "*Terminal deoxynucleotidyl transferase*")

**TGF:** factor transformante del crecimiento (del inglés, "*transforming growth factor*")

**TLR:** receptor tipo aduana (del inglés "*toll-like receptor*")

**TNF:** factor de necrosis tumoral (del inglés, "*tumoral necrosis factor*")

**TRAIL:** ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (del inglés, "*TNF-related apoptosis-inducing ligand*")

**Treg:** linfocitos T reguladores

**TSLP:** linfopoyetina humana del estroma tímico (del inglés, "*thymic stromal lymphopoietin*")

# Introducción



# 1. Células dendríticas humanas

## 1.1. Características generales

Las células dendríticas (CDs) son las células presentadoras de antígeno (CPA) por excelencia. En este sentido, son las células más eficaces a la hora de activar la respuesta linfocitaria T primaria, siendo capaces de captar y presentar antígenos a los linfocitos T naïve y de modular la respuesta del sistema inmune, constituyendo por lo tanto el nexo de unión fundamental entre la respuesta inmune innata y la adaptativa.

Las células dendríticas se describieron por primera vez en 1868, cuando Paul Langerhans identificó en la epidermis humana, una población celular con características morfológicas peculiares, asociadas a la presencia de prolongaciones citoplasmáticas<sup>1</sup>. No obstante, Paul Langerhans les atribuyó una función equivocada, al creer que se trataba de innervación intra-epidérmica. Actualmente sabemos que esta población celular corresponde a las células de Langerhans de la piel. No es hasta casi un siglo más tarde cuando en 1973, Ralph Steinman y Zanvil Cohn identificaron también la presencia de este tipo de células de morfología peculiar en el bazo de ratón<sup>2</sup>. Es entonces cuando Steinman denominó por primera vez a estas células “*células dendríticas*” (del griego *dendron*, que significa árbol), debido a su morfología característica, con amplias proyecciones citoplasmáticas que recordaban a las neuronas del sistema nervioso, y descubrió además, su función primordial en la respuesta inmune<sup>3</sup>; todo ello abrió un nuevo campo de investigación dentro de la inmunología con importantes repercusiones científicas y clínicas, que le valieron a Steinman numerosos premios, entre los que merece destacar el premio Nobel de Medicina en 2011<sup>ref.4</sup>.

En los años posteriores al descubrimiento de las CDs, y en especial durante las dos últimas décadas del siglo pasado, se ha avanzado de forma notable en el conocimiento y aplicación del extraordinario potencial de las CDs a la hora de orquestar la respuesta del sistema inmune<sup>5-10</sup>. Así, en la actualidad, a las CDs se les

atribuyen entre otras, funciones clave en el control de la especificidad, magnitud y polaridad de la respuesta inmune<sup>11,12</sup>. Las CDs controlan los diferentes tipos de respuesta inmune específica, incluyendo las respuestas implicadas en la defensa frente a microorganismos patógenos y células tumorales, y el desarrollo de enfermedades autoinmunes<sup>11,12</sup>. Para llevar a cabo su función primordial de “centinelas” del sistema inmune, hoy sabemos que las CDs en reposo están distribuidas por todos los tejidos del organismo, estando presentes en el tejido conectivo de la mayoría de órganos linfoides y no linfoides como la piel, corazón, pulmones, intestino, hígado e incluso en el sistema nervioso central<sup>13,14</sup>. Tras la captación del antígeno, las CDs migran desde los tejidos periféricos hasta la localización primordial de las CDs activadas: las áreas ricas en células T de los órganos linfoides secundarios, lugar de encuentro de las CDs con los linfocitos T, a los que presentan los péptidos derivados del procesamiento del antígeno captado<sup>15</sup>.

Debido a la ausencia de marcadores universales que nos permitan reconocer de forma específica al conjunto de las CDs, desde el punto de vista fenotípico estas células se identifican por su expresión elevada de moléculas involucradas en la presentación de antígenos (moléculas HLA de clase I y II como HLA-DR), en ausencia de marcadores de otras líneas celulares que también expresan moléculas HLA de clase II en situación basal como los linfocitos B (CD19<sup>neg</sup>) y monocitos (CD14<sup>neg</sup>), o tras activación, como ocurre con las células T (TCR<sup>neg</sup>/CD3<sup>neg</sup>) y NK (CD56<sup>neg</sup>)<sup>12,16</sup>.

## 1.2. Subpoblaciones de células dendríticas humanas

Aunque en conjunto las células dendríticas son capaces de llevar a cabo de forma general las funciones descritas, es decir, de procesar y presentar antígenos a los linfocitos T vírgenes para iniciar/modular la respuesta inmune, dentro de ellas se identifican diferentes subpoblaciones celulares con características fenotípicas y funcionales distintas<sup>17</sup>: las CDs plasmocitoides (CDp) y las células dendríticas mieloides convencionales o clásicas (CDc). En sangre periférica (SP) humana, donde el conjunto de las células dendríticas representa una población minoritaria de leucocitos (<1%), es



posible diferenciar fenotípicamente estas subpoblaciones mediante distintos marcadores<sup>18</sup>. Así, la población de CDp expresa BDCA2 (CD303), además de niveles elevados de la cadena alfa del receptor de la interleucina 3 (CD123), en ausencia de CD11c, siendo capaz de producir y secretar de forma rápida y en respuesta a infecciones virales, cantidades elevadas de interferón (IFN) $\alpha$ <sup>19</sup>. Por su parte, las CDc, expresan CD11c y CD33 en su membrana y se subdividen en dos subpoblaciones principales: a) las CDc que expresan BDCA1 (CD1c), con un papel destacado en la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> ref.<sup>20</sup>, y; b) las CDc BDCA3<sup>++</sup> (CD141<sup>++</sup>) que poseen capacidad de capturar células muertas y realizar una presentación cruzada de antígenos exógenos, ofreciendo así un mecanismo alternativo capaz de activar células T CD8<sup>+</sup> específicas de patógenos que no infectan directamente a las CD<sup>s</sup><sup>21</sup>. Estas diferencias fenotípicas y funcionales entre las CDp y las CDc sugieren que ambas subpoblaciones desempeñan papeles funcionales distintos, aunque complementarios, en la respuesta inmune.

En tejidos diferentes de la sangre, el nivel de heterogeneidad de las CD<sup>s</sup> se refleja también en las múltiples denominaciones que reciben estas células según su localización anatómica. Esto es debido sobre todo a la especialización de la función presentadora/inmunomoduladora adquirida en cada tipo de tejido; tal es el caso de las células de Langerhans que se localizan en el epitelio escamoso estratificado de la piel, las células de la microglia del parénquima cerebral o las CD<sup>s</sup> del timo, entre otras<sup>22-24</sup>.

Además de las poblaciones de CD<sup>s</sup> antes referidas, existen otras células que se encuentran fenotípicamente y funcionalmente a caballo entre las CD<sup>s</sup> (sobre todo las CDc) y los monocitos clásicos; son las denominadas "células dendríticas derivadas de monocitos" o monocitos "no clásicos"<sup>25</sup>. Este subtipo de monocitos expresa el receptor de baja afinidad para el fragmento Fc de la IgG (Fc $\gamma$ RIII o CD16), es CD14<sup>neg/débil</sup> y CD11c<sup>+</sup> ref.<sup>25</sup>. Actualmente se cree que más que una subpoblación de CD<sup>s</sup>, estas células constituyen una subpoblación minoritaria de monocitos, diferente del monocito clásico inflamatorio<sup>25</sup>. Numerosos trabajos han puesto de manifiesto que estas células

CD16<sup>+</sup>/CD14<sup>neg/débil</sup> están incrementadas en número (y actividad funcional) en la SP de pacientes con diversas enfermedades inflamatorias crónicas<sup>26,27</sup>, infecciones<sup>28,29</sup>, enfermedades autoinmunes<sup>30,31</sup> y tumores<sup>32-34</sup>, e incluso en condiciones fisiológicas –p. ej. en sujetos de edad avanzada<sup>35</sup>–, hallazgos que apoyan una actividad funcional relevante en procesos de renovación celular aumentada y/o lesión tisular<sup>36</sup>. Debido a que esta subpoblación de células presentadoras está más relacionada con los monocitos que con las CDs propiamente dichas, no haremos referencia a la misma en esta introducción de la memoria del trabajo doctoral realizado.

### 1.3. Origen y ontogenia de las células dendríticas

Desde el descubrimiento de las CDs, se ha debatido ampliamente sobre su origen y su relación con el monocito. Así, hoy está bien establecido que las CDs tienen su origen en médula ósea (MO) a partir de una célula *stem* hematopoyética<sup>37</sup>; no obstante, los precursores específicos de las CDs, a los que se les atribuye tanto un origen mieloide como linfoide<sup>38,39</sup>, siguen sin estar claramente definidos<sup>40-42</sup>. El modelo tradicional de ontogenia de las CDs sugiere la existencia de diferentes vías y líneas hematopoyéticas de diferenciación a CDs funcionalmente distintas<sup>41,43</sup>. De acuerdo con este modelo, las CDc derivarían de un precursor mieloide, mientras que las CDp se originarían a partir de un progenitor linfoide común temprano<sup>43</sup>. Este modelo se basa en el hecho de que las CDp de SP humana carecen de marcadores mieloides y, a diferencia de las CDc, requieren de la presencia de interleucina 3 (IL3) para su diferenciación, pero no del factor estimulante de colonias gránulo-monocíticas (GM-CSF)<sup>44</sup>. Otros estudios, por el contrario, han aportado evidencias que sugieren la existencia de un precursor común a todas las CDs, con características de célula progenitora mieloide/linfoide y plasticidad para generar tanto CDp como CDc<sup>39,45,46</sup>. En consonancia con estos últimos estudios, las hipótesis más actuales sugieren que ambas subpoblaciones de CDs (CDp y CDc) comparten un mismo precursor, con potencial de diferenciación restringido a línea mieloide, y común con el precursor monocítico<sup>37,46,47</sup>.

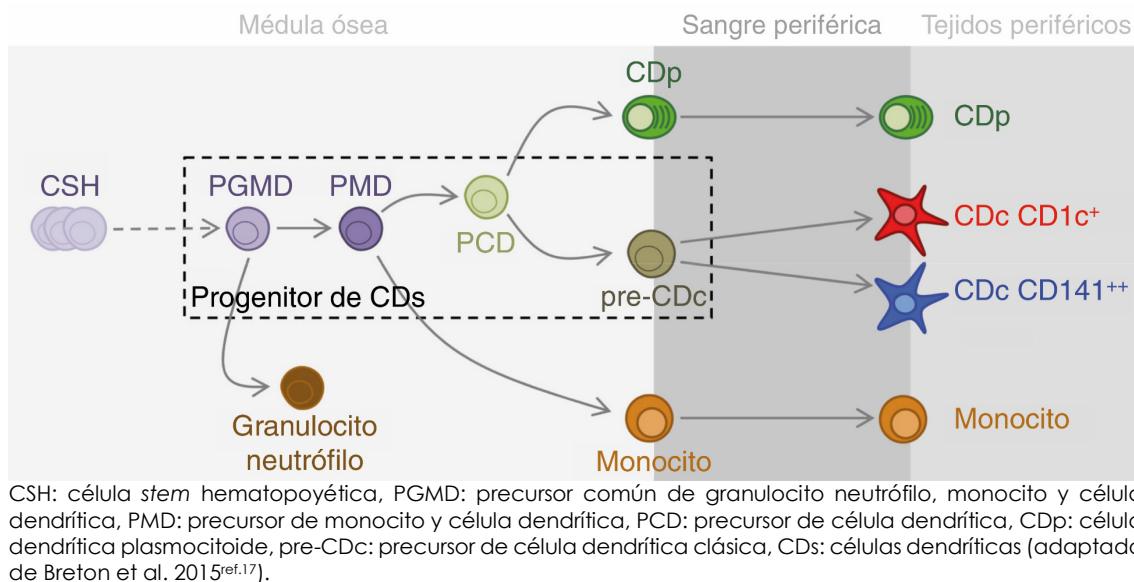
Este precursor común se identificó mediante estudios *in vitro* primero en el ratón<sup>46,48-50</sup> y más recientemente también en el ser humano<sup>37</sup>. De acuerdo con este modelo, todas las subpoblaciones de CD<sup>s</sup> hematopoyéticas humanas compartirían un ancestro común<sup>37,46,47</sup> con capacidad de diferenciación restringida a granulocito neutrófilo, monocito y CD<sup>s</sup>. Este precursor se localizaría en MO y en cordón umbilical, pero no en sangre periférica o en los tejidos linfoides periféricos<sup>37</sup>. Fenotípicamente, carecería de marcadores de línea celular (Lin<sup>neg</sup>) y expresaría CD34, CD38 de intensidad elevada, CD135 (FLT3), CD115 (receptor del factor estimulador de colonias monocíticas) y CD117 (receptor tirosin kinasa KIT, receptor de "stem cell factor")<sup>17,37,47</sup>. A medida que se diferencia, este precursor perdería su potencial de diversificación a distintas líneas y daría lugar a un progenitor restringido a monocito y CD<sup>s</sup>. A partir de este último progenitor se originaría finalmente el precursor específico de CD (PCD). Según Lee et al., este PCD (Lin<sup>neg</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>++</sup>, CD135<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD10<sup>neg</sup>, CD115<sup>neg</sup>, CD116<sup>neg</sup> - receptor de GM-CSF-, CD123<sup>++</sup>) representaría  $\approx 2\%$  de las células CD34<sup>+</sup> de MO humana<sup>37</sup>, y ya habría perdido su potencial de diferenciación a monocito, de manera que solo sería capaz de dar lugar a CD<sup>s</sup>, diferenciándose finalmente a CDp y a un precursor de la CDc (Figura 1).

El precursor de la CDc saldría de la MO, transitaría por la sangre periférica y cuando se asienta en un micromedioambiente adecuado, como el de los órganos linfoides periféricos, se diferenciaría en las dos subpoblaciones de CDc (CD1c<sup>+</sup> y CD141<sup>++</sup>)<sup>37,49,51</sup>. Debido a su corta vida media<sup>49,52</sup>, estas dos subpoblaciones de CDc necesitarían una reposición continua por parte del precursor de MO<sup>53,54</sup>.

A diferencia del proceso de maduración de las CDc que se completaría fuera de la MO, el de las CDp se realiza enteramente en este tejido, donde fueron identificadas por primera vez estas células por Olweus et al. en 1997<sup>55</sup>. Estos autores demostraron en un modelo humano (MO fetal) que el precursor de CDp expresa de forma característica CD123 de forma intensa, además de CD4, HLA-DR y CD34. Posteriormente se comprobó que este precursor expresa además niveles bajos de CD64 y CD13, junto a una expresión intensa de otros antígenos mieloides como CD36 y CD33<sup>56</sup>.

Desde el punto de vista morfológico, los precursores de CDp se caracterizan por presentar una membrana plasmática lisa asociada a un citoplasma agranular y abundante, y un núcleo ligeramente lobulado. Asimismo, en su trabajo, Olweus et al.<sup>55</sup> demostraron que el cultivo de precursores de CDp en presencia de GM-CSF e IL3 inducía en pocos días, su diferenciación *in vitro* a una célula CD1a<sup>+</sup>, asociada a la formación de agregados celulares y la adquisición de una morfología típica de célula dendrítica, todo ello acompañado de la adquisición de una potente capacidad estimuladora de linfocitos T CD4<sup>+</sup> alogénicos.

**Figura 1.- Modelo hipotético de la ontogenia de las diferentes subpoblaciones de células dendríticas humanas**



La identificación y caracterización del precursor de la CDp humana ha supuesto un avance fundamental para el conocimiento de estas células. Aun así, en el momento de iniciar este trabajo seguían sin conocerse los diferentes estadios por los que atraviesa la diferenciación de la CDp en MO, y los cambios fenotípicos y funcionales asociados a su maduración desde el precursor hematopoyético CD34<sup>+</sup> hasta su salida a sangre<sup>55,57</sup>. Este desconocimiento deriva por un lado, de la dificultad existente a la hora de definir distintos estadios madurativos a partir de una población celular escasamente representada en MO humana ( $\approx 3\%$  del total de células CD34<sup>+</sup> de MO fetal<sup>55</sup>) y por otra parte, de la ausencia de marcadores específicos que los identifiquen.

Algunas poblaciones de CDs, como las CDs de la microglía o las células de Langerhans de la piel, constituyen una excepción a este modelo de desarrollo, al tratarse de células que no dependen de la MO para su reposición<sup>23,58,59</sup>. En este sentido, la autorrenovación de estas células ocurriría fuera de la MO, al tener capacidad de proliferar de forma masiva en respuesta a estímulos inflamatorios. De acuerdo con estos hallazgos, se ha demostrado, tanto en modelos murinos como en el hombre, que la célula de Langerhans tiene su origen en un precursor embrionario que coloniza la epidermis de forma temprana, antes del nacimiento<sup>59-61</sup>.

## 1.4. Funciones de las células dendríticas

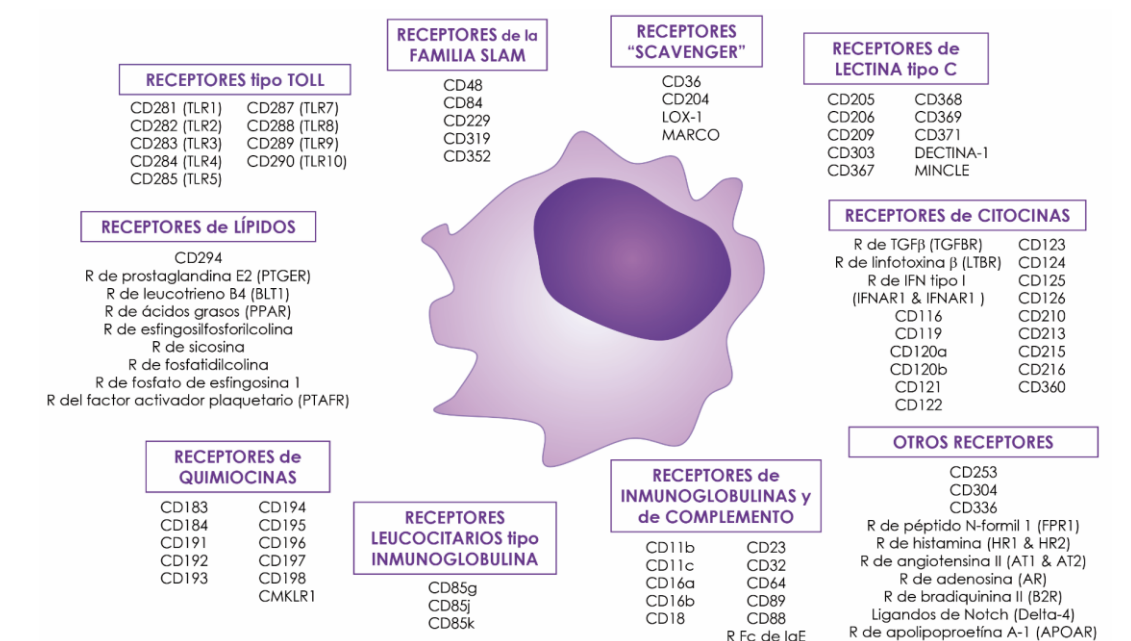
En términos generales podemos decir que las CDs desempeñan dos funciones principales: a) la inducción de respuestas inmunogénicas, y b) la inducción de tolerancia inmune específica.

### 1.4.1. Inducción de respuestas inmunogénicas

Desde el punto de vista funcional, las CDs presentes en los tejidos periféricos en estado de reposo se caracterizan por presentar una gran actividad fagocítica y endocítica asociada a un bajo potencial de activación de linfocitos T<sup>55,62</sup>. Este estado se traduce fenotípicamente en una expresión relativamente baja de moléculas presentadoras de antígeno (HLA) de clase II y de moléculas coestimuladoras<sup>44</sup>; esto sería debido a que la principal función de las CDs en los tejidos periféricos es la de registrar de forma constante el medio que las rodea en busca de antígenos extraños<sup>43,63</sup>. Para ello, las CDs disponen de un amplio abanico de receptores de membrana, entre los que se incluyen: a) receptores para fragmentos Fc de la IgG (FcγRII o CD32)<sup>ref.64</sup>, b) receptores del complemento<sup>65</sup>, c) integrinas, d) receptores de citocinas y quimiocinas, y e) receptores de lectina de tipo C<sup>ref.66</sup> entre los que se incluye un amplio grupo de receptores relacionados estructural y funcionalmente entre sí, como el receptor de manosa (CD206), de fucosa y de N-acetilglucosamina, entre otros receptores que

reconocen carbohidratos de las glicoproteínas y glicolípidos presentes en la envoltura externa de los microorganismos -langerina (CD207), dectina1 (CD369), BDCA2 (CD303), DEC205 (CD205) o DC-SIGN (CD209)-; además las CDs expresan también receptores de la familia NOD (receptores que reconocen nucleótidos y dominios de oligomerización), receptores “carroñeros” (del inglés “scavenger”) <sup>67</sup> (CD36, LOX1 y CD91), receptores de la familia SLAM (que intervienen en la comunicación célula-célula y reconocen ligandos homotípicos) y receptores de tipo *toll* (de sus siglas en inglés, TLR) <sup>68</sup> capaces de reconocer patrones moleculares altamente conservados y comunes a diferentes patógenos <sup>69,70</sup>. En la figura 2 se representan de forma esquemática los subtipos más relevantes de receptores expresados por las CDs.

**Figura 2.- Representación esquemática de los diferentes tipos de receptores que expresan las células dendríticas humanas**



R: receptor

Tras el reconocimiento del patógeno por parte de las CDs, este es internalizado mediante fagocitosis, pinocitosis y/o endocitosis <sup>71-73</sup>; a partir de este momento, las células dendríticas van a migrar de la periferia a los ganglios linfáticos regionales, donde se aloja un gran número de linfocitos T vírgenes <sup>43,74</sup>. A lo largo de este proceso de migración, las CDs van procesando los antígenos y ensamblando los péptidos

antigénicos resultantes en moléculas HLA, que finalmente se expresan en la membrana citoplasmática; de esta forma los péptidos asociados a las mismas pueden ser reconocidos por el receptor para antígeno de los linfocitos T<sup>75</sup>. Paralelamente, las CDs experimentan un proceso de maduración<sup>76,77</sup>, transformándose en células dendríticas diferenciadas.

La maduración de las células dendríticas se asocia a una pérdida progresiva de su capacidad para capturar antígenos y a la adquisición gradual de un potencial cada vez mayor para desencadenar una respuesta inmune por parte de linfocitos T vírgenes<sup>78</sup>. Para ello, las células dendríticas procesan los antígenos capturados, reduciéndolos a péptidos que se ensamblan en moléculas HLA<sup>75</sup>; finalmente, los complejos péptido-HLA son transportados a la superficie celular<sup>75</sup>. Además, esto va unido a una serie de cambios fenotípicos, que en gran medida reflejan los cambios funcionales que sufren las células dendríticas a lo largo de su migración y maduración. Así, las células dendríticas activadas o maduras expresan marcadores que las distinguen de las CDs inmaduras o en reposo; entre otros marcadores, merece destacar: a) CD83, una de las proteínas más características de la célula dendrítica madura, con un papel fundamental en la inducción de respuestas T inmunogénicas<sup>79</sup>, y; b) DC-LAMP (CD208), una proteína lisosomal que interviene en el procesamiento antigénico, específica también de células dendríticas maduras<sup>80</sup>. Además, a medida que madura la célula dendrítica, se produce un aumento significativo de la expresión de moléculas coestimuladoras (p. ej. CD40, CD80 y CD86), moléculas de adhesión (p. ej. CD54) y moléculas HLA<sup>63,79</sup>, a la vez que se modifica su patrón de expresión de receptores de quimiocinas, entre otros cambios fenotípicos<sup>73,81</sup>.

Cuando la célula dendrítica alcanza los órganos linfoides secundarios, esta célula está en condiciones óptimas de activación y maduración, siendo capaz de presentar antígenos a los linfocitos T vírgenes y de memoria<sup>15,82,83</sup>, e inducirles a que desencadenen una respuesta inmune específica de antígeno<sup>8</sup>. La célula dendrítica también puede activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, a través de una presentación cruzada de antígenos<sup>84</sup>. Esto último es debido a que la célula dendrítica es capaz de:

a) internalizar células infectadas por virus, células tumorales o células procedentes de trasplantes, b) procesarlas en su interior, extrayendo de forma eficiente sus péptidos, y c) presentar dichos péptidos en moléculas HLA de clase I. Este proceso es fundamental a la hora de generar inmunidad contra virus con tropismo restringido a ciertos tejidos (p. ej. virus que infectan células no hematopoyéticas)<sup>85</sup> o para mantener la tolerancia periférica a antígenos propios<sup>86</sup>.

El tipo de respuesta que finalmente ponen en marcha los linfocitos T activados tras la presentación antigénica, va a depender de varios factores como: a) la concentración antigénica alcanzada en la célula dendrítica, b) la afinidad del receptor específico para antígeno del linfocito T (de sus siglas en inglés, "TCR") por el complejo formado por la molécula HLA que presenta el péptido y el péptido, c) la duración de la interacción, d) el estado de maduración de la célula dendrítica, e) el patrón de citocinas que secrete, y f) el tipo de estímulo responsable de su maduración<sup>87,88</sup>. Todos estos factores condicionarán por tanto, la polarización del linfocito T con el que contacta la célula dendrítica hacia el patrón de respuesta linfoide T más adecuado para combatir con mayor eficacia la infección por un microorganismo concreto<sup>42,89,90</sup> (p. ej.  $T_H1$ ,  $T_H2$  o  $T_H17$ ).

### 1.4.2. Inducción de tolerancia inmune

Desde hace tiempo se sabe que las CD no solo procesan antígenos extraños (o alterados) para inducir inmunidad<sup>15,91</sup>, sino que tienen también un papel fundamental en la inducción de tolerancia<sup>92</sup>, tanto central como periférica<sup>93,94</sup>; no obstante, siguen sin conocerse en detalle los factores que influyen en su puesta en marcha. Por una parte, se ha comprobado que en ausencia de señales de infección o inflamación, las células dendríticas capturan y presentan antígenos del propio individuo a los linfocitos T, manteniéndose en un estado inactivo o de inmadurez, que resulta en la inhibición de la proliferación y la inducción de anergia sobre células T reactivas<sup>91,92</sup>. En algún momento se atribuyó esta función a un subtipo específico de célula dendrítica y en concreto, a la subpoblación de CDp<sup>95-97</sup>, al observarse que en determinadas condiciones estas células



promovían la generación de anergia y la delección clonal de linfocitos T, junto a una expansión de linfocitos T reguladores. No obstante, hallazgos más recientes parecen indicar que no existirían poblaciones concretas de CDs especializadas en inducir inmunotolerancia<sup>98</sup>, sino que todas ellas serían capaces de inducir tanto respuestas inmunogénicas como tolerogénicas, sobre los linfocitos T con los que interactúan. El tipo de respuesta resultante (inmunogénica vs. tolerogénica) dependería de las señales del micromedioambiente, del patrón de expresión de moléculas de membrana que presenten en ese momento (a su vez relacionado con su estado de maduración/activación) y de la activación selectiva de vías de señalización específicas que promueven la inducción de células T reguladoras<sup>99</sup>, o de la interacción de estos linfocitos T reguladores con las CDs<sup>100</sup>. En general, las CDs inductoras de tolerancia muestran: a) un fenotipo caracterizado por una baja expresión de moléculas coestimuladoras<sup>101</sup> y niveles elevados de moléculas y receptores reguladores, b) una capacidad limitada de producción de IFN $\alpha$  y otras citocinas, c) una respuesta a la estimulación mediada por receptores *Toll-like* disminuida y e) capacidad de inducir expansión de células T reguladoras<sup>102</sup>.

Debido a la capacidad de las CDs para iniciar o modular la respuesta inmune, en los últimos años se ha incrementado considerablemente el interés en su utilización terapéutica como herramienta potencialmente capaz de modular la respuesta inmune en campos tan diversos como el trasplante de órganos y tejidos, enfermedades autoinmunes, alergia, enfermedades infecciosas, o la inmunidad antitumoral<sup>97,103-106</sup>.

## 1.5. La célula dendrítica plasmocitoide

La CDp constituye una población celular escasamente representada en sangre periférica (0.1% - 0.6% del total de los leucocitos de adultos sanos<sup>16,55</sup>) descrita por primera vez en 1958 por Lennert y Remmele en la zona paracortical de un ganglio reactivo humano<sup>107</sup>. A lo largo de los años esta célula ha sido renombrada en varias ocasiones (p. ej. célula plasmática asociada a linfocito T, célula T plasmocitoide y

monocito plasmocitoide, entre otras denominaciones<sup>107-109</sup>) en función del conocimiento que progresivamente se iba adquiriendo sobre ella. Su denominación actual se basa en su parecido morfológico con la célula plasmática. Precisamente debido a la morfología plasmocitoide de la CDp, se pensó que esta célula estaba especializada en la producción y secreción de proteínas; sin embargo, a diferencia de la célula plasmática, pronto se comprobó que esas proteínas no eran inmunoglobulinas (Ig), sino citocinas, especialmente el IFN $\alpha$  antiviral<sup>74,110</sup>. Característicamente, una vez colocada en cultivo en ausencia de IL3, la CDp entra (rápidamente) en apoptosis; por el contrario, la presencia de esta interleucina en el cultivo promueve la formación de agregados celulares y el desarrollo de vellosidades y proyecciones citoplasmáticas<sup>44,55</sup>, además de inducir la adquisición de un fenotipo de CDp activada.

### 1.5.1. Características fenotípicas de la célula dendrítica plasmocitoide

Como hemos mencionado anteriormente, desde el punto de vista inmunofenotípico, la CDp presente en sangre periférica de sujetos sanos se caracteriza por coexpresar de forma intensa en su membrana la cadena alfa del receptor de la IL3 (CD123) y moléculas HLA de clase II (p. ej. HLA-DR), en ausencia de marcadores de línea T (TCR<sup>neg</sup>/CD3<sup>neg</sup>), B (CD19<sup>neg</sup>), NK (CD56<sup>neg</sup>) y monocitarios (CD14<sup>neg</sup>)<sup>16,19,111</sup>. Además, la CDp no expresa la integrina CD11c, ni marcadores característicos de línea mieloide como CD13 o CD33, lo que la diferencia de la CDc CD11c<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>. La CDp de sangre periférica expresa de forma específica y homogénea BDCA2 (CD303); por el contrario, la expresión de este marcador en la célula dendrítica de médula ósea varía según su grado de maduración<sup>112</sup>; además, la CDp también expresa BDCA4 (CD304), aunque este último marcador no es específico al haberse detectado también en otras poblaciones celulares, sobre todo en condiciones de activación<sup>18,113,114</sup>.

Numerosos trabajos han puesto de manifiesto el importante papel que desempeña BDCA2 en la CDp. BDCA2 es un receptor de lectina tipo C con un único

dominio extracelular de reconocimiento de carbohidratos, una región transmembrana y una cola corta citoplasmática que no alberga ningún motivo de señalización. Esta molécula tiene capacidad para internalizar antígenos y constituye uno de los receptores responsables de inhibir la producción de IFN $\alpha$  y el aumento de expresión de moléculas coestimuladoras en la CDp, en respuesta a ligandos de TLR7 y TLR9<sup>115,116</sup>, mecanismo del que hablaremos con mayor detalle más adelante (ver sección 1.5.2.1.). Otra proteína expresada de forma intensa en la CDp humana es la proteína asociada a CD2 (de sus siglas en inglés, CD2AP); esta proteína intracelular se encarga de regular la expresión de BDCA2 mediante la formación de complejos que inhiben la actividad de la ligasa de ubiquitina E3 CBL<sup>117</sup>.

Además de BDCA2 y CD2AP, la CDp humana expresa también otros receptores encargados de inhibir la producción de IFN $\alpha$  mediada por TLR9, entre los que se encuentran ILT7 (CD85g) -expresado exclusivamente en CDp-, el receptor de la IgE (Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ ), y NKp44 (CD336)<sup>118-120</sup>. Asimismo, la CDp expresa otros muchos receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, mostrando niveles elevados del receptor "carroñero" CD36, del receptor de lectina tipo C CD205 (aunque es CD209<sup>neg</sup>), y de los receptores de tipo *Toll* TLR7 y TLR9; estos últimos receptores reconocen ADN de microorganismos y/o ARN vírico y son expresados selectivamente en el compartimento endosomal de la célula dendrítica, lo que diferencia la CDp de las CDc, que expresan TLR1, TLR2 y TLR3 en su membrana<sup>121</sup>. A su vez, la expresión de los receptores endosomales TLR7 y TLR9 permite a la CDp, a diferencia del resto de células del sistema inmune, responder frente a infecciones víricas y bacterianas sin necesidad de estar infectada<sup>122</sup>. TLR7 reconoce ARN de cadena sencilla rico en residuos de guanosina o uridina procedente de virus<sup>123</sup>, mientras que TLR9 detecta ADN monocatenario que contenga motivos CpG no metilados (secuencias específicas de ADN que contienen los dinucleótidos citosina-guanina de forma no metilada) que se encuentra de forma habitual en el genoma de bacterias y virus<sup>70</sup>; además, TLR9 detecta también oligonucleótidos sintéticos como los oligodesoxinucleótidos CpG (CpG-ODN<sup>70</sup>). En este sentido, merece destacar que la respuesta de la CDp varía según el tipo de

bacteria/virus que reconoce, habiéndose sugerido que esto podría estar relacionado con la localización específica de los TLR activados dentro del endosoma. Asimismo, diferentes tipos de CpG desencadenan respuestas biológicas cualitativamente distintas: mientras que CpG-A (prototipo ODN 2216) se une a TLR9 del endosoma e induce la liberación de niveles elevados de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  y apenas induce diferenciación a célula dendrítica madura, CpG-B (prototipo ODN 2006) se une a TLR9 del lisosoma, no induce secreción de IFN de tipo I, y favorece de forma clara la diferenciación de la CDp a una célula fenotípica y funcionalmente madura, capaz de producir IL8 y de expresar moléculas coestimuladoras y presentadoras de antígeno<sup>124</sup>. En cambio, ambos tipos de CpG inducen la producción de niveles similares de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (de sus siglas en inglés, TNF $\alpha$ )<sup>125</sup>. La localización intracelular de TLR9 sería determinante a la hora de discriminar entre ácidos nucleicos exógenos y propios, y prevendría la activación espontánea de la CDp inducida por estos últimos, con la consiguiente producción de IFN $\alpha$ <sup>126</sup>. De hecho, recientemente se ha sugerido que el fallo en este mecanismo podría estar relacionado con la patogenia de algunas enfermedades autoinmunes<sup>127</sup>.

Como hemos mencionado anteriormente, ILT7 (CD85g) se expresa de forma exclusiva en la CDp, mientras que otros receptores leucocitarios de tipo Ig como CD85j (ILT2) y CD85k (ILT3) están presentes, no solo en la CDp, sino también en la superficie de la CDc y del monocito, entre otros tipos celulares<sup>128</sup>.

Respecto a la expresión de moléculas coestimuladoras, la CDp carece de forma constitutiva (en situación basal) de positividad para CD40, CD80 y CD86, o expresa de forma parcial y débil estas proteínas<sup>128</sup>. La expresión de otras moléculas señalizadoras y de adhesión también es variable. Así, tal como se recoge en la tabla 1, la CDp de SP es CD4<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup> y CD62L<sup>+</sup> y expresa de forma intensa algunos receptores de la familia SLAM<sup>129,130</sup>; en concreto, de los seis miembros de receptores SLAM expresa CD84 (SLAMF5), CD229 (SLAMF3), CD319 (SLAMF7) y CD352 (SLAMF6 o NTBA)<sup>129</sup>, mientras que son CD150<sup>neg</sup> (SLAMF1), CD244<sup>neg</sup> (2B4)<sup>129,130</sup> y CD48<sup>+</sup> (SLAMF2)<sup>129</sup>. Esta última proteína es una molécula funcionalmente muy relacionada con la familia de proteínas SLAM, aunque estrictamente no pertenece a la misma<sup>131</sup>; de hecho, a excepción de CD48,

todos los receptores de la familia SLAM son ligandos de sí mismos, estando involucrados en interacciones célula-célula en procesos de comunicación entre CD<sub>s</sub> plasmocitoides, y entre CD<sub>p</sub> y el resto de células del sistema inmune<sup>129</sup>.

A diferencia de la CD<sub>c</sub>, no se conoce en profundidad cuales son las quimiocinas inflamatorias y las moléculas de adhesión que específicamente dirigen la migración de la CD<sub>p</sub>. No obstante, se ha descrito que la CD<sub>p</sub> expresa receptores de quimiocinas como CD183, CD184, CD197 y CMKLR1<sup>129,132</sup>. Estos hallazgos sugieren que dichos receptores probablemente sean los responsables de mediar la migración de la CD<sub>p</sub> desde SP a los órganos linfoides secundarios y/o a los tejidos en los que se ha puesto en marcha una respuesta inflamatoria. Al igual que ocurre con la CD<sub>c</sub>, la CD<sub>p</sub> aumenta su expresión de CD197 tras estimulación a través de TLRs<sup>133</sup>; además, se ha demostrado que son atraídas por la quimiocina CCL21 (ligando de CD197), lo que sugiere que la molécula CD197 (CCR7) desempeña un importante papel en la migración de la CD<sub>p</sub> al ganglio linfático<sup>132</sup>.

Aunque la mayoría de las CD<sub>p</sub> carecen de CD2 y de CD56 (moléculas involucradas en procesos de señalización y adhesión celular, respectivamente), recientemente se ha referido la existencia de subpoblaciones de CD<sub>p</sub> que expresan estos marcadores, incluso simultáneamente, pudiendo este hallazgo tener importantes implicaciones a la hora de definir la célula de origen de las neoplasias de CD<sub>p</sub>, como veremos más adelante (sección 2)<sup>134-136</sup>. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en el ser humano se ha descrito la existencia de dos subpoblaciones de CD<sub>p</sub> en función del patrón de expresión de CD2<sup>136,137</sup>: a) una subpoblación mayoritaria CD2<sup>neg</sup> y b) otra minoritaria CD2<sup>++</sup>, que representa alrededor del 20% del total de las CD<sub>p</sub> circulantes<sup>137</sup>. Ambas subpoblaciones estarían presentes tanto en sangre periférica como en amígdala<sup>137</sup>; además, se han detectado también CD<sub>p</sub> CD2<sup>++</sup> en algunas biopsias tumorales, hallazgo que sugiere que esta subpoblación de CD<sub>p</sub> podría tener un papel relevante en la inmunovigilancia antitumoral<sup>137</sup>, al ser también más eficientes a la hora de inducir proliferación de linfocitos T naïve alogénicos<sup>137</sup>. Ambas subpoblaciones de CD<sub>p</sub> CD2<sup>neg</sup> y CD2<sup>+</sup> expresan las moléculas citotóxicas granzima B y TRAIL (CD253)<sup>137</sup>.

Clásicamente se ha considerado que, en situación basal, la CDp no expresa la molécula de adhesión CD56<sup>138</sup>; sin embargo, más recientemente se ha demostrado la existencia en SP y MO humana de una población de CDp CD56<sup>+</sup>, que representaría  $\approx 5\%$  de las CDp en estos tejidos<sup>134-136</sup>. Estas células expresan CD2, CD13 y CD33, además de marcadores asociados a CDp como CD303 y CD304<sup>135,136</sup>. Respecto a las CDp mayoritarias CD56<sup>neg</sup>, se ha visto que las CDp CD56<sup>+</sup> secretan menor cantidad de IFN $\alpha$  tras estimulación con CpG, y tienen una menor capacidad endocítica<sup>135,136</sup>. Según estos trabajos, se trataría de una nueva población de CDs ontogénicamente más cercana a la CDc que a la CDp, y con características intermedias entre ambas<sup>136</sup> o superponibles a las de una célula dendrítica inmadura<sup>135</sup>. Debido a la expresión de CD56, entre otras características, estos trabajos proponen que la subpoblación de CDp CD56<sup>+</sup> podría representar la contrapartida celular normal de la neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica<sup>134-136</sup>. También se ha descrito que una vacuna para la prevención de la encefalitis transmitida por garrapatas (FSME-IMMUN) induce la expresión de CD56 en la CDp, asociándose esta con la expresión de otras moléculas citotóxicas, como TRAIL y granzima B<sup>139</sup>. Estas CDp activadas CD56<sup>+</sup> han demostrado tener capacidad tumoricida<sup>139</sup>.

En la tabla 1 se recogen de forma esquemática las principales características fenotípicas de la CDp de sangre periférica de adultos sanos, en lo que respecta a la expresión de receptores de reconocimiento de patrones moleculares, moléculas de adhesión y señalización, receptores de citocinas y quimiocinas y otras moléculas funcionalmente relevantes. A diferencia de la CDp de SP sobre la que disponemos de una amplia información acerca de su fenotipo, en el momento de iniciar este trabajo la información existente acerca de las características fenotípicas de los precursores de CDp humana de MO era bastante limitada, ya que casi la totalidad de los estudios dirigidos a caracterizar fenotípicamente la CDp se habían centrado de forma específica en muestras de sangre periférica humana y de ratón<sup>140,141</sup>.

## 1.5.2. Características funcionales de la célula dendrítica plasmocitoide

### 1.5.2.1 Respuesta anti-viral

Desde el punto de vista funcional, se ha caracterizado ampliamente la CDp por el papel que desempeña en la respuesta inmune innata y adaptativa, y su relevancia en la conexión entre ambos tipos de respuesta inmune<sup>19,142</sup>; es más, en la actualidad se conoce que las CDp son las células dendríticas especializadas en la respuesta inmune anti-viral, debido a su potente capacidad para secretar niveles elevados de interferones antivirales (sobre todo de IFN $\alpha$ ), desde las fases más tempranas de una infección vírica<sup>142,143</sup>. Si bien existen muchos otros tipos celulares capaces de sintetizar IFN $\alpha$ , ninguno lo hace con la rapidez y en niveles tan elevados como la CDp. Así, se estima que pese a su baja representación en sangre, la CDp es la responsable de la secreción de más del 95% del IFN $\alpha$  producido por las células mononucleares de sangre periférica cuando entran en contacto con virus, como por ejemplo ocurre con el virus del herpes simple<sup>110</sup>. La producción de esta citocina se desencadena de forma prácticamente inmediata en respuesta a infecciones por virus encapsulados e infecciones bacterianas; la detección de ácidos nucleicos víricos y otros productos derivados de los virus -a través de los receptores TLR7 y TLR9 presentes en la CDp-, hace que se desencadene la síntesis y secreción de grandes cantidades de IFN $\alpha$  que controlará la replicación vírica<sup>110,144,145</sup>, de ahí su implicación principal en la defensa antiviral<sup>74,110</sup>. Además del IFN $\alpha$ , la CDp produce citocinas pro-inflamatorias como el TNF $\alpha$  que favorece la maduración de la CDp, e IL6<sup>146</sup>. La estimulación de la CDp a través de TLR7/9 también induce: 1) la expresión de TRAIL, que tras la correspondiente señalización, media la entrada en apoptosis de células infectadas sensibles a TRAIL y de los tumores que expresen el receptor de TRAIL<sup>147</sup>, y; 2) la expresión de granzima B, confiriendo a la CDp activada propiedades citotóxicas<sup>148</sup>.

**Tabla 1: Perfil fenotípico de la célula dendrítica plasmocitoide humana de sangre periférica en condiciones basales.**

Grupo funcional de moléculas		Molécula	Patrón de expresión
Moléculas presentadoras de antígeno		HLA de clase I	++
		HLA de clase II (HLA-DR)	++
Receptores asociados a reconocimiento de patógenos	Receptores de lectina tipo C	CD205	++
		CD209	-
		CD303	+
	Receptores tipo <i>Toll</i>	CD281 (TLR1)	-
		CD282 (TLR2)	-
		cyCD283 (TLR3)	-
		CD284 (TLR4)	-
		CD285 (TLR5)	-
		cyCD287 (TLR7)	+
		CD288 (TLR8)	-
		cyCD289 (TLR9)	+
	Receptores leucocitarios de tipo inmunoglobulina	CD85g	+
		CD85j	+
		CD85k	+
	Receptores de inmunoglobulinas	CD16	-
		CD32	+
		CD64	-
		FcεRIα	+
	Receptores del complemento	CD11b	-
		CD11c	-
	Otras moléculas asociadas a reconocimiento de antígenos	CD14	-
		CD36	+
		CD336	+
Receptores de señalización	Receptores de la familia SLAM	CD48	+
		CD84	+
		CD150	-
		CD229	+
		CD244	-
		CD319	+
		CD352	+
	Otras moléculas de señalización	CD2	-/+
		cyCD2AP	+
		CD5	-
		CD7	±
Moléculas de adhesión		CD4	+
		CD22	+
		CD56	-/+
		CD62L	+
Moléculas coestimuladoras		CD40	-
		CD80	-
		CD86	-
Receptores de citocinas		CD116	-
		CD117	-
		CD123	+++
Receptores de quimiocinas		CD183	+
		CD184	+
		CD197	+
		CMKLR1	+
Antígenos mieloides		CD13	-
		CD33	-
		cyMieloperoxidasa	-
		cyLisozima	-
Otras proteínas		CD38	++
		CD45RA	+
		CD253	+
		CD304	+
		CLA	±
		NG2	-
		cyTcl1	±

"-": ausente/negativo; "±": positivo débil; "-/+": expresión parcial; "+": positivo; "++": positivo fuerte; "+++": positivo muy intenso; cy: citoplasmático; CLA: antígeno cutáneo linfocitario; NG2: antígeno neural/glial 2; Tcl1: Proteína 1 del linfoma/leucemia de linfocitos T

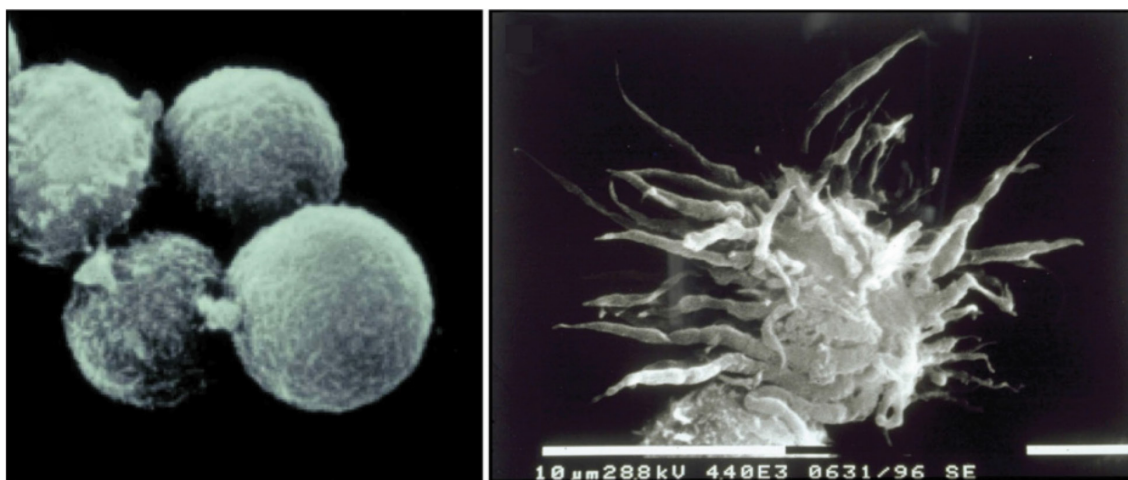


Una gran variedad de estímulos microbianos, entre los que estarían los asociados a componentes de virus y bacterias como los oligonucleótidos CpG<sup>149-151</sup> o la interacción de IL3 con su receptor de alta afinidad (CD123), son capaces de desencadenar la maduración de la CDp, durante la cual esta incrementa la expresión de moléculas HLA-DR, y con ello, su capacidad de presentación antigénica<sup>152</sup>. Este proceso va asociado también a un aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86), y a una disminución de la capacidad para producir IFN $\alpha$ <sup>153</sup>. Estas características funcionales de la CDp activada han condicionado que a esta célula se le haya denominado también "CDc derivada de CDp", al asemejarse sus características fenotípicas y funcionales a las de una célula dendrítica convencional/mieloide. En este estado de activación, la CDp recluta células T y NK activadas, induce la activación de células NK y macrófagos, promueve la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes a células efectoras que secretan IFN $\gamma$  e IL10, induce el desarrollo de células T secretoras de IL4 y la diferenciación de células plasmáticas, facilita la síntesis de IFN $\alpha$  con el efecto anti-viral asociado al mismo, e induce la activación funcional de CDc<sup>145</sup>.

En la transición de CDp a la denominada CDc derivada de CDp, la CDp sufre un cambio radical en su morfología. Así, la CDp redondeada adquiere una morfología típica de célula dendrítica con proyecciones citoplasmáticas evidentes, que no se observan en su estado de reposo (Figura 3). Las "dendritas" permiten a la CDp interactuar de manera más eficiente con diferentes subpoblaciones de células T<sup>63,154</sup>. Además, al formarse las proyecciones citoplasmáticas, aumenta considerablemente la superficie de contacto entre el linfocito T y la CDp, fortaleciendo así la formación y estabilidad de la sinapsis inmunológica<sup>155</sup>. En su conjunto, estas características morfológicas y biológicas cambiantes apoyan la noción de que la CDp representa un subtipo de célula del sistema inmune con características únicas y flexibles, con capacidad para intercambiar funciones de célula efectora profesional del sistema inmune innato y de célula presentadora de antígenos profesional, que conecta la respuesta inmune innata y adaptativa. No obstante, cabe señalar que otros autores no observan los cambios referidos ni las proyecciones citoplasmáticas típicas del estado de

CDp madura/activada, por lo que atribuyen la morfología “dendrítica” de la CDp activada a un artefacto resultante de su manipulación en cultivos *in vitro*<sup>156</sup>. Algo similar ocurriría también con su postulada contrapartida neoplásica, que no adquiere morfología “dendrítica” a no ser que la CDp tumoral sea colocada en cultivo<sup>157</sup>.

**Figura 3.- Morfología de la célula dendrítica plasmocitoide visualizada con microscopio electrónico de barrido.** La CDp en reposo muestra una forma esférica (panel de la izquierda) mientras que en su estado activado adquiere una morfología “dendrítica” (panel de la derecha) (adaptada de Colonna et al. 2004<sup>ref.19</sup>).



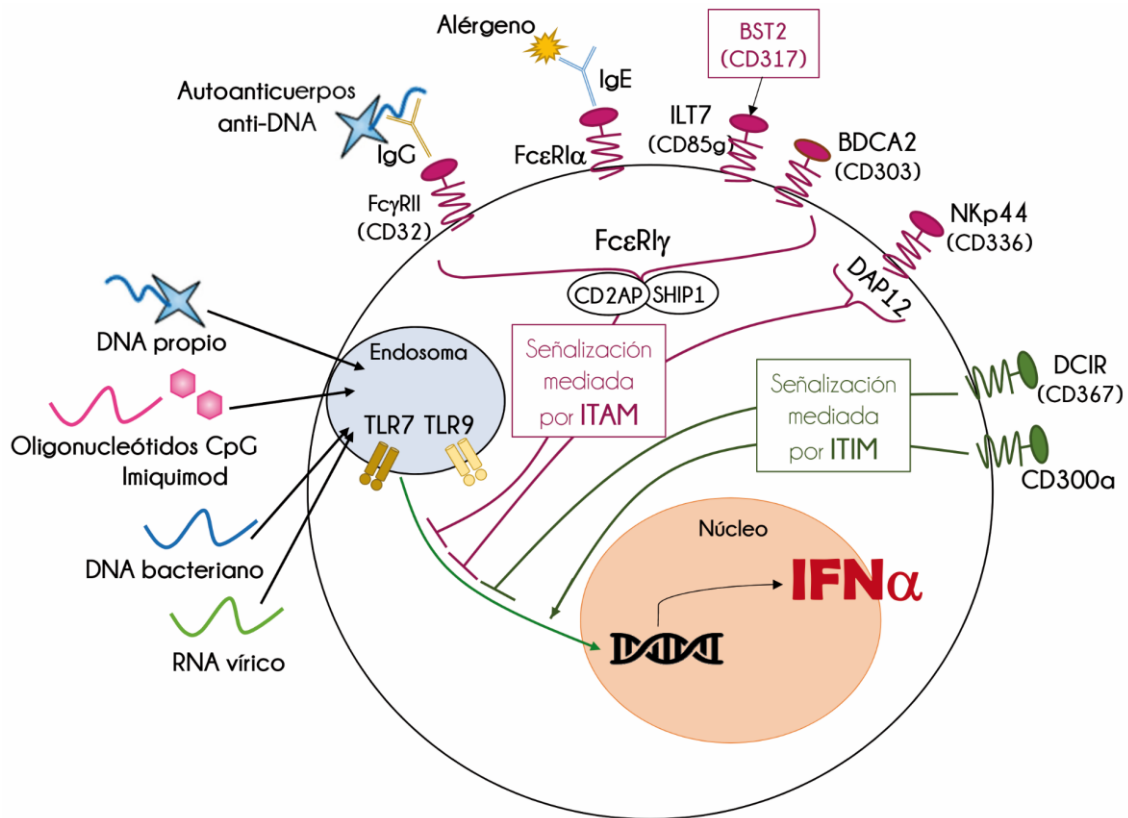
El efecto perjudicial de una secreción descontrolada de IFN $\alpha$  para las demás células del organismo, hace que el mecanismo por el que este se produce y libera, tenga que estar regulado de forma estrecha. En este sentido, la propia CDp expresa diferentes receptores cuya función es la regulación/inhibición de la producción de IFN $\alpha$  y que pueden dividirse en dos grupos principales (Figura 4). Por un lado, los receptores que no generan directamente señales intracelulares, sino que requieren de una molécula adaptadora, grupo que en la CDp estaría representado por el receptor de alta afinidad para el fragmento Fc de la IgE (Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ )<sup>116</sup> o la proteína DAP12<sup>ref.158</sup>; ambos adaptadores contienen un motivo ITAM a nivel intracitoplasmático<sup>116,159</sup>. Por el contrario, el segundo grupo de receptores contiene motivos intracelulares de inhibición basados en tirosina (abreviado de sus siglas en inglés, ITIM), que serían capaces de transmitir por sí solos señales inhibitorias<sup>116</sup>. Estos receptores presentes en la CDp, independientemente de si señalizan a través de motivos ITAMs o ITIMs, controlan la amplitud de la secreción

de IFNs de tipo I en respuesta a ligandos de TLR, además de regular el grado de activación de la CDp<sup>116</sup>. En general, los receptores de CDp que se unen a los adaptadores que contienen motivos ITAM, inducen cascadas de señalización que inhiben la producción de IFN $\alpha$  mediada por TLR<sup>119</sup>. Entre los receptores conocidos de este tipo se incluyen BDCA2<sup>115,160</sup>, ILT7<sup>119</sup> y Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ <sup>120</sup>, que señalizan a través de Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ <sup>116</sup>, y NKp44 (CD336) que lo hace a través de DAP12<sup>111</sup>. A su vez, los receptores que señalizan directamente a través de motivos ITIM en su porción intracelular incluyen DCIR (CD367) y CD300a (Figura 4). Finalmente, merece destacar que la señalización mediada por BDCA2 durante la activación inducida por TLR9 también podría inhibir la maduración de CDp y su capacidad para estimular linfocitos T naïve<sup>161</sup>. A su vez, el incremento de la señalización mediada por BDCA2 a través de motivos ITAM está regulada por CD2AP, mientras que la teterina/CD317 (BST2) -una proteína expresada en diferentes tipos de células tras la exposición a IFN $\alpha$ - actuaría como ligando fisiológico de ILT7<sup>111</sup>. CD317 también se expresa en numerosos tumores<sup>162</sup>, lo cual hace pensar que este podría ser un mecanismo utilizado por las células tumorales para evitar la activación de CDp que infiltran el tejido neoplásico y así, escapar de la vigilancia antitumoral.

A pesar de que la CDp representa una población celular minoritaria en sangre y en los tejidos linfoides, su gran potencial para producir IFN $\alpha$ , no solo en respuesta a virus y bacterias sino también en respuesta a antígenos propios, hace que se haya sugerido su posible participación en la generación de respuestas de autoinmunidad<sup>57,68,163</sup>. De hecho, la producción incontrolada de IFN $\alpha$  por parte de la CDp se ha involucrado en la patogenia de algunas enfermedades autoinmunes e inflamatorias, entre las que se incluyen el lupus eritematoso sistémico<sup>164,165</sup> y la psoriasis<sup>166</sup>. En ambas enfermedades, la activación de las CDp podría ser debida a la conversión (aberrante) de ácidos nucleicos propios en ligandos de TLR7/9, mediante la formación de inmunocomplejos, la unión a péptidos microbianos, y otros mecanismos todavía sin identificar<sup>167,168</sup>. Además del efecto nocivo mediado por IFN $\alpha$  sobre los tejidos propios, la CDp se diferencia a CDp madura con capacidad de presentar antígenos y dirigir la respuesta T, amplificando potencialmente también el efecto adverso de la respuesta autoinmune

en este grupo de enfermedades. Por otra parte, se cree que la CDp podría contribuir también a la cronificación de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), debido a una activación persistente y una producción incontrolada de IFN $\alpha$  por parte de la misma<sup>169</sup>.

**Figura 4.- Regulación de la producción de IFN $\alpha$  inducida por TLRs.** La CDp expresa receptores que contienen motivos ITAM e ITIM, con un papel importante en la regulación de las respuestas inducidas por TLR7 y TLR9; ambos receptores se activan por una gran variedad de estímulos tanto exógenos como endógenos que llevan a la secreción de IFN $\alpha$ . La activación a través de los receptores Fc $\gamma$ RII, Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ , ILT7, BDCA2 y NKp44, cuya señalización está mediada por motivos ITAM, y DCIR inhibe la producción de IFN $\alpha$ , mientras que CD300a promueve su activación.



Tal como hemos mencionado anteriormente en esta introducción, con el fin de evitar los efectos perjudiciales y la producción continuada de IFN $\alpha$ , la CDp expresa en su membrana receptores cuyo objetivo es atenuar o inhibir la respuesta inducida por TLR. La unión de los respectivos ligandos a estos receptores favorece la función presentadora de la CDp, al mismo tiempo que disminuye su capacidad para producir IFN $\alpha$ <sup>116</sup>, representando así estas moléculas, dianas terapéuticas interesantes a la hora de

controlar procesos de autoinmunidad y el rechazo de injertos. De acuerdo con esta hipótesis, un trabajo reciente ha demostrado el potencial terapéutico de un anticuerpo monoclonal frente a BDCA2 (24F4A) que induce la internalización de este receptor y la inhibición de la producción de IFN $\alpha$  por parte de la CDp activada vía TLR7/9, tanto en modelos *in vitro* de CDp de SP de sujetos sanos y de pacientes con lupus eritematoso sistémico, como en un modelo de tratamiento *in vivo* en monos<sup>170</sup>. Esta terapia tendría la ventaja de que no conlleva la depleción de CDp<sup>170</sup>, que a su vez afectaría también la inmunidad anti-viral.

### 1.5.2.2 Tolerancia inmune

La CDp podría constituir una de las poblaciones de CDs candidata a generar tolerancia inmune periférica<sup>95-97</sup>, ya que en su estado inmaduro posee una baja capacidad para inducir la proliferación de células T<sup>19,140</sup>. De hecho, la CDp es capaz de suprimir de forma indirecta la respuesta T, entre otros mecanismos, mediante la inducción de anergia o la delección clonal de linfocitos T activados por antígeno, y a través de la inducción de linfocitos T reguladores (Treg)<sup>93,171</sup>. Se cree que tanto la CDp inmadura/no activada como la activada inducen la formación de linfocitos Treg mediante expresión de IDO (indolamina 2,3-dioxigenasa)<sup>172</sup> y de ICOSL (de las siglas en inglés de "ligando de la molécula coestimuladora")<sup>173</sup>.

Recientemente se ha sugerido además, que la CDp podría desempeñar también un papel relevante en la inducción de tolerancia central<sup>174</sup>. De acuerdo con esta hipótesis, la CDp recirculante podría presentar antígenos propios en el timo y contribuir a la inactivación y/o delección de los precursores T autorreactivos<sup>93</sup>. Esta hipótesis se basa en la detección de CDp junto a linfocitos Treg (Foxp3<sup>+</sup>) en timo humano, y en que la activación de la CDp mediante CD40L (CD154) e IL3, promueve a su vez sobre los timocitos autólogos, el desarrollo de linfocitos Treg naturales Foxp3<sup>+</sup> (nTreg)<sup>93</sup>. De forma similar, se ha descrito que la CDp tímica humana activada con CpG y linfopoyetina humana del estroma tímico (TSLP) también induce la generación de nTreg<sup>171</sup>. En ambos trabajos los linfocitos Treg inducidos por la CDp producen más IL10 y menos TGF- $\beta$  que

las células nTreg activadas por la CDc bajo las mismas condiciones<sup>93,171</sup>. Esto sugiere un efecto complementario de ambas subpoblaciones de CDs en el desarrollo de tolerancia central T. Ahora bien, todavía queda por confirmar que *in vivo*, la CDp promueva también la diferenciación de timocitos a nTreg.

En la actualidad se cree que la CDp contribuye a generar un estado de tolerancia periférica de las células T que contribuiría a la tolerancia generada frente a antígenos de la dieta en la mucosa oral<sup>175</sup> e intestinal<sup>176</sup>, a la tolerancia frente a órganos y tejidos trasplantados<sup>104</sup>, y a fomentar el escape de las células tumorales a la respuesta del sistema inmune<sup>102,177,178</sup>.

En este sentido, cabe señalar que además de participar en la tolerancia inmune frente a proteínas propias “normales”, existen evidencias que demuestran que la CDp también podría participar en la inducción de tolerancia frente a proteínas tumorales<sup>102,177-179</sup>. Así, diferentes estudios sugieren que la CDp presente en el ambiente tumoral es una célula tolerogénica<sup>179</sup>, al estar presente en números muy significativos en el infiltrado inmune de diferentes tipos de cáncer como el melanoma, los tumores de cabeza y cuello, el cáncer de ovario y el cáncer de próstata, correlacionándose habitualmente dichos infiltrados de forma inversa con la supervivencia de los pacientes<sup>180,181</sup>. Hoy se sabe además que las CDp que infiltran el microambiente tumoral son mayoritariamente inmaduras<sup>102</sup>, de ahí que se piense que sean predominantemente inmunosupresoras o tolerogénicas. Por otra parte, en los últimos años se han encontrado evidencias de que en estos tumores, las células neoplásicas y el ambiente peritumoral conseguirían bloquear la respuesta anti-tumoral manteniendo a las CDp en un estado tolerogénico/inactivo<sup>182</sup>. Entre los mecanismos responsables de mantener a las CDp en ese estado se incluyen la secreción de prostaglandina E2 (PGE2) y TGF- $\beta$  que inhiben de manera sinérgica la producción de IFN $\alpha$  y TNF $\alpha$ , además de inhibir la expresión de CD197, impidiendo así la migración de la CDp a los ganglios linfáticos de drenaje, y finalmente también la activación de linfocitos T específicos de tumor, como consecuencia del fallo en la presentación antigénica<sup>182,183</sup>. Además, la CDp una vez estimulada con PGE2 favorecería de forma indirecta, mediante la liberación de IL6 e IL8,

la proliferación de las células tumorales, su migración e invasión, además de la angiogénesis tumoral<sup>183</sup>. Por todo ello, cabe plantear que la presencia de CDp en el ambiente peritumoral podría favorecer la progresión del tumor. Sin embargo, existen también estudios que plantean que la situación podría ser muy diferente si la CDp se activase de forma adecuada, ya que en tal caso podría desencadenar una respuesta inmune anti-tumoral, e incluso destruir activamente las células tumorales<sup>139</sup>, mediante por ejemplo, mecanismos de citotoxicidad mediada por TRAIL<sup>147</sup>.

Ante los hallazgos anteriormente expuestos cabe plantear que la inhibición de los procesos que favorecen la infiltración del tumor por CDp inmaduras, o que contribuyan a promover la activación de las CDp del entorno peritumoral, constituyen potenciales dianas terapéuticas en la inmunoterapia del cáncer<sup>184,185</sup>. Un ejemplo del potencial efecto inmunógeno de las CDp en cáncer es el tratamiento de algunos tipos de tumores cutáneos malignos con agonistas de TLR7 como el Imiquimod<sup>178</sup>, capaces de inducir la activación de CDp, y cuyos resultados preliminares están siendo muy prometedores<sup>186,187</sup>.

En resumen, la CDp es capaz de reconocer tanto antígenos exógenos como propios y responder a estos mediante un amplio abanico de reacciones que oscilan desde la activación, polarización y diferenciación de linfocitos T a células efectoras, a la inducción de tolerancia inmune. Esta variedad de funciones requiere de mecanismos de regulación estrictos, cuyo fallo desemboca en enfermedades, como ocurriría en algunos procesos tumorales e infecciones víricas (Figura 4).

## 2. Neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica

La neoplasia de precursores de célula dendrítica plasmocitoide es un subtipo de leucemia/linfoma muy poco frecuente -<1% de todas las leucemias mielobásticas

agudas (LMA)<sup>188-</sup> y clínicamente muy agresivo<sup>189-193</sup>. Hoy se conoce que las células tumorales de pacientes con neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide presentan, desde el punto de vista de su ontogenia, muchas similitudes con las células normales de línea de CDp, tanto desde el punto de vista morfológico<sup>194</sup> y fenotípico<sup>195,196</sup>, como molecular<sup>194,197,198</sup> y funcional<sup>195,199</sup>.

Pese a que el origen celular de la neoplasia de CDp se conoce desde hace relativamente poco tiempo<sup>195,200</sup>, con anterioridad se habían descrito numerosos casos aislados y series relativamente cortas de pacientes clasificados en distintos subtipos de leucemias y linfomas que hoy sabemos se correspondían con neoplasias de precursores de CDp. En este sentido, la nomenclatura de esta entidad ha variado repetidamente a lo largo de los años, en función de la información que se ha ido adquiriendo sobre la enfermedad, la expresión de la molécula de adhesión CD56, y el tropismo de las células tumorales por la piel<sup>189,201-204</sup>. Debido precisamente a que las células tumorales expresan casi de forma sistemática CD56, en ausencia de marcadores específicos de línea mieloide o linfoide B y T, su origen se asoció a la línea NK. Así, esta neoplasia se ha denominado "linfoma blástico de células NK", "leucemia de células natural killer CD4<sup>+</sup> agranular", o "leucemia/linfoma blástico natural killer", constituyendo esta denominación la terminología propuesta en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2001<sup>ref.202</sup>. A partir de esta fecha, a raíz de la publicación de las primeras evidencias que apuntaban a que su origen podría estar en un precursor de CDp y no de célula NK, se utilizó una terminología más descriptiva para referirse a esta enfermedad, como "neoplasia agranular hematodérmica CD4<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>", hasta que finalmente se corroboró su origen en una CDp<sup>200</sup>, momento a partir del cual se pasó a emplear su actual denominación: neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica (NCDPB).

El primer caso de NCDPB referido en la literatura fue descrito en 1994 por Adachi et al. quienes observaron que las células tumorales de un paciente con un linfoma cutáneo CD4<sup>+</sup> expresaban CD56 de forma intensa<sup>205</sup>. Pese a que en 1999 Lucio et al. describen por primera vez un caso de linfoma cutáneo CD4<sup>+</sup> que refleja las



características fenotípicas de la CDp de SP, y que en 2005 en la clasificación de los linfomas cutáneos de la OMS/EORTC pasa a recomendarse la sustitución del término “linfoma blástico de células natural killer” por el de “neoplasia hematodérmica CD4<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>”, sugiriéndose además que el origen de esta neoplasia podría estar en un precursor de CDp<sup>189,195,196</sup>, no ha sido hasta la clasificación más reciente de la OMS de 2008 de los tumores hematopoyéticos y de tejidos linfoides, cuando se ha considerado a esta neoplasia como una entidad independiente y bien definida<sup>157</sup>. Tras la confirmación de que su origen procede de una célula comprometida a línea de célula dendrítica plasmocitoide, este tumor recibe la denominación de neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica (NCDPB)<sup>157</sup>.

## 2.1. Características generales

La NCDPB se clasifica según la OMS dentro del grupo de leucemias mieloblásticas agudas y otras neoplasias relacionadas de precursores mieloides, posiblemente debido al postulado origen mieloide de la CDp normal<sup>197</sup>, y al hecho de que con cierta frecuencia se ha asociado esta neoplasia con síndromes mielodisplásicos (SMD)<sup>189,206</sup> y/o LMA de línea mielomonocítica<sup>189,207-209</sup>. Incluso, en estos pacientes se ha sugerido la posibilidad de la existencia de una mutación inicial en un precursor común<sup>207</sup>. Sin embargo, estas entidades (NCDPB y LMA o SMD) son claramente diferentes, como se ha comprobado posteriormente a nivel genético/molecular<sup>197,198</sup>.

En la actualidad sigue sin esclarecerse la patogenia de la NCDPB. En este sentido, no existe evidencia de una relación directa o indirecta con infección por el virus de Epstein-Barr, ni con otros virus, o con otros factores etiológicos bien definidos, a excepción de su frecuente asociación con SMD<sup>189,206</sup>; en base a este último hallazgo se ha sugerido la posibilidad de que la NCDPB y los SMD puedan compartir factores patogénicos<sup>157</sup>.

Desde el punto de vista epidemiológico, se trata de una neoplasia muy poco frecuente y de claro predominio en varones (cociente varón/mujer de 3:1)<sup>157,189,190,210</sup>.

Afecta principalmente a pacientes de edad avanzada (>65 años)<sup>157,189,190,210</sup> aunque puede aparecer a cualquier edad, incluso en la infancia<sup>211,212</sup>.

Clínicamente se comporta como una enfermedad muy agresiva, de pronóstico nefasto con los tratamientos convencionales empleados en la actualidad. Con frecuencia los pacientes debutan con lesiones cutáneas y/o otros signos/síntomas de infiltración extramedular, asociados o no a citopenias periféricas (sobre todo anemia y trombopenia) y otras manifestaciones característicamente relacionadas con la infiltración de MO y SP por las células tumorales<sup>157</sup>; aun así habitualmente no suelen referir afectación del estado general<sup>145,196,213</sup>. En algunos casos, el cuadro clínico no es tan florido al inicio de la enfermedad, existiendo incluso formas asintomáticas en las que en el momento del diagnóstico solo se evidencia la presencia de lesiones cutáneas, en ausencia de clínica sistémica<sup>189,190</sup>. No obstante, invariablemente la neoplasia progresa y termina mostrando un curso clínico maligno<sup>145,157,204</sup>. En el momento actual se desconoce qué factores o circunstancias condicionan las diferentes formas clínicas de presentación; tampoco ha sido posible identificar los factores pronósticos que determinan la evolución de la enfermedad<sup>214,215</sup>. En cualquier caso, como se detalla más adelante en la sección 2.5., aunque la tasa de respuestas completas al tratamiento es elevada, los pacientes generalmente recaen, observándose con frecuencia en esta fase de recaída, afectación extramedular seguida de una fase leucémica fulminante y resistente al tratamiento, que acaba con la vida del paciente<sup>157</sup>.

El diagnóstico actual de la NCDPB se basa en las características clínicas de la enfermedad y el aspecto morfológico/inmunohistoquímico, fenotípico y, menos frecuentemente, genético de las células tumorales<sup>157</sup>. Al diagnóstico, el estudio histopatológico e inmunohistoquímico, con relativa frecuencia, se lleva a cabo en biopsias de las lesiones cutáneas, en las que las células tumorales muestran un aspecto pleomórfico, con un tamaño celular variable, de pequeño a grande, y núcleo redondeado u oval, siendo la cromatina del núcleo fina y de aspecto blástico<sup>210</sup>. El citoplasma es ligeramente basófilo y agranular, pero muestra una estructura heterogénea con un anillo o "collar de perlas" de microvacuolas debajo de la

membrana citoplasmática<sup>189,213</sup>. A su vez, las células tumorales presentes en la MO muestran unas características morfológicas similares a las descritas en la piel<sup>190</sup>. La confirmación diagnóstica se realiza mediante la caracterización inmunofenotípica de las células tumorales por citometría de flujo (CMF), facilitada sobre todo cuando existe afectación leucémica periférica y/o medular<sup>190,216</sup>. A pesar de los avances alcanzados desde la publicación de los primeros casos de NCDPB, el diagnóstico genético/molecular de esta neoplasia sigue siendo difícil, al carecer de alteraciones genéticas recurrentes o de otros marcadores moleculares específicos<sup>217,218</sup>.

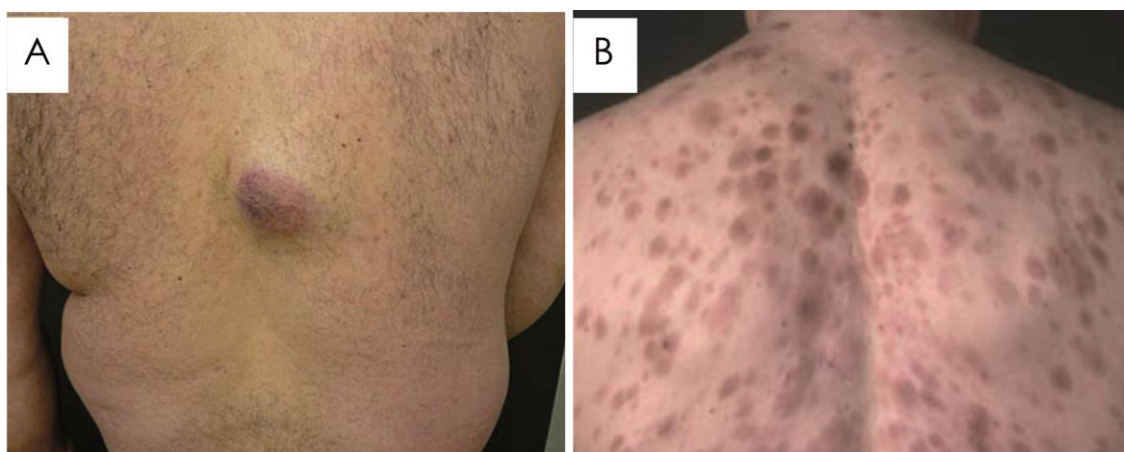
Todo ello, unido a que con relativa frecuencia las características clínicas y el aspecto morfológico y fenotípico de las células tumorales se solapan con las de otras hemopatías malignas, hace que el diagnóstico de esta entidad siga estando basado en criterios relativamente variables y diversos<sup>215,219,220</sup>. Esto conlleva que se planteen problemas de diagnóstico diferencial sobre todo con la LMA y otras neoplasias mieloides (como la leucemia mielomonocítica crónica o el sarcoma mieloide)<sup>157</sup>, pero también con neoplasias linfoides como los linfomas T cutáneos o la leucemia linfoblástica aguda (LLA), especialmente en las formas con presentación cutánea y en niños, respectivamente<sup>192</sup>.

## 2.2. Formas de presentación y características clínicas

La forma de presentación más habitual de la enfermedad (>80% de los casos) se asocia con la aparición de lesiones cutáneas asintomáticas, que suelen ser motivo de consulta. Se trata habitualmente de nódulos violáceos (la variante más frecuente), o de placas o infiltrados que se asemejan a hematomas, ya sean solitarios o múltiples<sup>221</sup> (Figura 5), que pueden localizarse en casi todos los territorios (cabeza, tronco y extremidades superiores e inferiores)<sup>190,193,198</sup>. Al microscopio óptico se observa infiltración dérmica por células de aspecto blástico (formas inmaduras) con características de CDp<sup>208,221</sup>. Dicho infiltrado no suele afectar la epidermis, aunque ocasionalmente puede extenderse hasta la grasa subcutánea<sup>222,223</sup>. Si bien el primer

signo de la enfermedad suele ser la aparición de lesiones cutáneas, la diseminación leucémica ocurre en la práctica totalidad de los casos a medida que progresa la enfermedad; de esta forma, la SP, MO y ganglios linfáticos, suelen verse afectados ya al diagnóstico en una proporción elevada de los pacientes (entre 50% y 96%)<sup>157,190-192</sup>. No obstante, pese a la frecuente infiltración cutánea, hay que tener en cuenta que la ausencia de lesiones cutáneas no descarta el diagnóstico de NCDPB, ya que hasta la mitad de los casos documentados debutan directamente con una fase leucémica, tras la que puede aparecer o no afectación de piel<sup>192,224</sup>.

**Figura 5.- Imágenes representativas de las distintas formas de presentación cutánea asociadas a NCDPB.** Paciente con un nódulo aislado (A), Julia et al. 2013<sup>ref.221</sup>; paciente con lesiones diseminadas (B), Cota et al. 2010<sup>ref.222</sup>.



Debido a su forma de presentación predominante con lesiones cutáneas (múltiples o solitarias), el primer médico especialista consultado suele ser el dermatólogo, al que puede pasarle inadvertido el componente hematológico asociado a esta enfermedad. Esto puede conllevar un retraso en el diagnóstico correcto del mismo, hasta que se evidencien otros síntomas asociados a la progresión de la neoplasia.

En el momento del diagnóstico suele observarse también la presencia de adenopatías (49%), esplenomegalia (34%), hepatomegalia (30%)<sup>190,192,196</sup>, afectación del sistema nervioso central (10%)<sup>192,196,221</sup> y, en menor medida ( $\leq 4\%$  de los casos), afectación de tejidos blandos, pulmón, amígdala, riñón, hueso, corazón, líquido pleural, mama y

órganos sexuales secundarios<sup>192,196</sup>. En los pocos casos descritos en los que se ha realizado autopsia, se observa afectación multiorgánica, lo cual demuestra la gran capacidad de diseminación de las células tumorales a múltiples tejidos y órganos<sup>225,226</sup>.

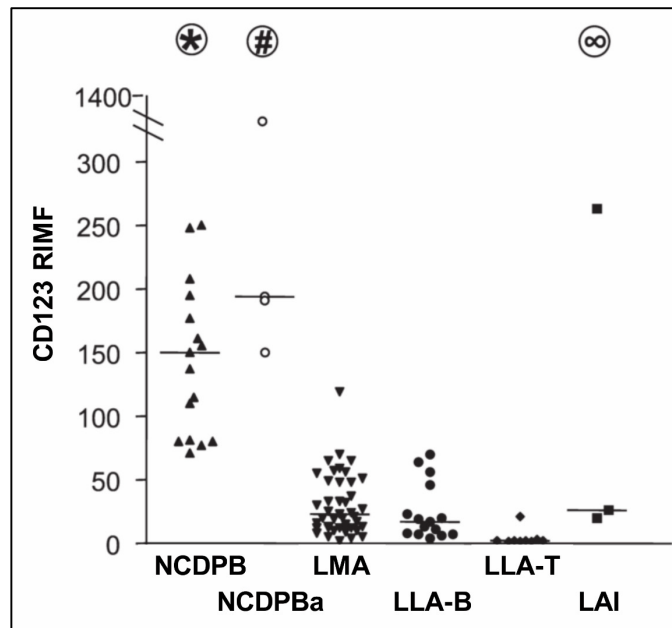
De forma específica, la afectación del sistema nervioso central (SNC) se ha referido en alrededor del 10% de los pacientes ya en el momento del diagnóstico<sup>189,190,192,221</sup>; no obstante, este porcentaje se eleva hasta más de un 30% en la recaída<sup>189,192</sup>. Por este motivo, varios estudios han recomendado la administración profiláctica en estos pacientes de medicación dirigida de forma específica a combatir la enfermedad meníngea<sup>189,192,211</sup>. La elevada tasa de recaída en SNC es similar a la de la LLA<sup>227</sup>, en la que la administración de profilaxis para evitar la infiltración neuromeníngea se realiza de forma sistemática, debido a la conocida tendencia de los linfoblastos a infiltrar el SNC. Pese a todo lo anterior, en la actualidad seguimos sin disponer de datos fiables en relación con la frecuencia real de casos diagnosticados de NCDPB que presentan infiltración oculta y/o evidente del SNC al diagnóstico, ya que no se realizan de forma sistemática en estos pacientes estudios de imagen o de líquido cefalorraquídeo, de manera que no es hasta la aparición de sintomatología neurológica cuando se procede a su evaluación<sup>221,226</sup>.

## 2.3. Características fenotípicas

Ante la sospecha de una NCDPB debe realizarse estudio inmunofenotípico para la confirmación del diagnóstico de la enfermedad. Esto es debido a que el inmunofenotipado (en especial por CMF) resulta la aproximación más sensible y específica para el diagnóstico de la enfermedad<sup>190,216</sup>. El fenotipo típico de las células tumorales de la NCDPB se corresponde habitualmente con el de células hematopoyéticas inmaduras (CD45<sup>+débil</sup>) que coexpresan CD4<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>++</sup> y CD123<sup>+/++</sup>, en ausencia de positividad para marcadores específicos de línea de granulocito neutrófilo (mieloperoxidasa<sup>neg</sup>), monocitaria (CD64<sup>neg</sup>, CD14<sup>neg</sup>) y linfoide T y B (CD3<sup>neg</sup>, CD19<sup>neg</sup>)<sup>188,189,192</sup>. La intensidad de expresión de CD123 evaluada por CMF

resulta especialmente útil como criterio diagnóstico debido a que permite discriminar esta entidad de otras hemopatías malignas<sup>217</sup> (Figura 6), especialmente cuando se acompaña de la expresión intensa de HLA-DR y del perfil fenotípico característico para los marcadores anteriormente referidos.

**Figura 6.- Niveles de expresión de CD123 en NCDPB frente a otros subtipos de hemopatías malignas (leucemias agudas).** Análisis comparativo de los niveles de expresión de CD123 entre NCDPB típicas (▲), NCDPB atípicas (NCDPBa) (○) y LMA (leucemia mieloblástica aguda) ▼, LLA-B (leucemia linfoblástica aguda de precursores B) ●, LLA-T (leucemia linfoblástica aguda T) ◆ y leucemia aguda indiferenciada (LAI) ■. Las líneas horizontales representan la mediana observada para cada grupo. RIMF: ratio entre la intensidad media de fluorescencia de CD123 y el control isotópico; \*p<0.0001, NCDPB vs. otras leucemias; ∞p=0.25, NCDPB vs. LAI; #p≤0.005 NCDPBa vs. LMA, LLA-B y LLA-T). Tomado de Garnache-Ottou et al., 2009<sup>ref.217</sup>



Además, los anticuerpos monoclonales anti-CD303 (BDCA2) y CD304 (BDCA4) producidos por Dzionek et al en el año 2000<sup>ref.18</sup> resultan también de gran utilidad a la hora de confirmar el diagnóstico de NCDPB. De ambos marcadores, resulta especialmente útil CD303, ya que es altamente específico de CDp normales y tumorales maduras<sup>112,217,228</sup>. Sin embargo, su expresión depende del estadio madurativo de la CDp, encontrándose habitualmente disminuida en aquellos casos con presentación medular/leucémica<sup>112,229</sup>. Por otro lado, a pesar de que la expresión de CD303 orienta

claramente el diagnóstico hacia una NCDPB, su ausencia no lo descartaría, ya que en  $\approx 35\%$  de los casos las células tumorales carecen de este marcador<sup>192,217,220</sup>. Igual que ocurre con CD303, CD2AP citoplasmático es un marcador específico de línea de CDp que se detecta en la mayoría ( $>80\%$ ) de las NCDPB<sup>156,192</sup>; al tratarse de un marcador selectivo de CDp resulta especialmente útil en el diagnóstico diferencial de esta entidad, aunque por el momento su uso prácticamente se restringe a análisis inmunohistoquímicos. Por el contrario, CD304 no es específico de las NCDPB, ya que también se expresa en los blastos de aproximadamente la mitad de las LLA de precursores B<sup>230,231</sup> y en algunas LMA<sup>232</sup>. La detección intracitoplasmática de niveles elevados del proto-oncogén Tc11 por CMF resulta también de gran utilidad para apoyar el diagnóstico de NCDPB, ya que ninguna otra leucemia aguda lo expresa con tanta intensidad<sup>233</sup>; sin embargo, al igual que ocurría con otros marcadores anteriormente citados, Tc11 no es un marcador específico de malignidad, ya que también lo expresan las CDp normales y reactivas<sup>209</sup>. Otros marcadores específicos de la CDp normal como CD85g (ILT7), no se detectan en la mayoría de las NCDPB, ni tampoco en líneas celulares derivadas de estas, por lo que no constituyen buenos marcadores diagnósticos<sup>233</sup>.

Además del patrón fenotípico descrito, las células tumorales de la NCDPB expresan con relativa frecuencia CD43, CD45RA, CLA, NG2, TdT y CD38, mientras que suelen ser negativas para CD34<sup>157,208,216</sup>. En este sentido, algunos autores llegan a considerar la positividad para CD34 como un marcador de exclusión de NCDPB<sup>189,217</sup>, aspecto que no ha podido ser corroborado en otras series en las que se han descrito casos aislados en los que las células tumorales expresan (parcialmente) CD34<sup>207,234</sup>.

Pese a lo anteriormente descrito, actualmente se reconoce que una fracción de las NCDPB presentan un perfil inmunofenotípico atípico, llegando estos casos a representar hasta una tercera parte de todos los pacientes<sup>235</sup>. Así, se han descrito casos de NCDPB cuyas células tumorales carecen de expresión de CD56<sup>236</sup> y/o CD4<sup>235</sup>, sin que estos hallazgos invaliden el diagnóstico de NCDPB. Además, actualmente se reconoce que las células tumorales de la NCDPB pueden expresar marcadores clásicamente asociados a la línea mieloide (CD13, CD33, CD36, CD117) o linfóide (CD2, CD7, CD22,

CD79a y TdT, entre otros)<sup>217,237</sup>, lo que ha suscitado nuevas dudas sobre el origen mieloide vs. linfóide de este precursor. La interpretación adecuada de la heterogeneidad fenotípica de las NCDPB y de la aparente infidelidad de línea de las células tumorales, asociada a la frecuente coexpresión de marcadores mieloides y linfoides, requiere de un conocimiento detallado de los cambios fenotípicos asociados a la maduración de los precursores normales de CDp, aspecto muy poco conocido en el momento actual.

Debido precisamente a la heterogeneidad fenotípica descrita, unida a la falta de marcadores específicos de CDp en una elevada proporción de NCDPB, esta entidad puede llegar a confundirse con otras hemopatías malignas como la LMA, LLA o linfomas T que, pese a tener un origen celular distinto, pueden mostrar infiltración cutánea por células tumorales que expresan también CD56 y/o CD4<sup>157,192</sup>.

## 2.4. Características genéticas y moleculares

En el momento del diagnóstico, dos tercios de los pacientes que presentan NCDPB muestran alteraciones genéticas, habitualmente en el contexto de "cariotipos complejos"<sup>157,189,238</sup>. En la actualidad se reconocen seis alteraciones cromosómicas recurrentes, aunque ninguna es específica ni permite asegurar el diagnóstico de la enfermedad<sup>218</sup>, al detectarse también en otras neoplasias mieloides y linfoides. Estas alteraciones recurrentes incluyen alteraciones a nivel de las regiones cromosómicas 5q21 o 5q34 (72% de los casos), 12p12 (64%), 13q13-21 (64%), 6q23-qter (50%), 15q (43%) y la monosomía del cromosoma 9 (28%)<sup>194,218,239</sup>. Mediante estudios de *arrays* de hibridación genómica comparada (de sus siglas en inglés, CGH) se han encontrado cuatro regiones frecuentemente delecionadas en las células tumorales de estos pacientes a nivel de las regiones cromosómicas 9p21.3 (CDKN2A/CDKN2B), 13q13.1-q14.3 (RB1), 12p13.2-p13.1 (CDKN1B) y 13q11-q12 (LATS2), observándose pérdidas bialélicas, o múltiples deleciones heterocigóticas en más del 90% de los casos estudiados<sup>198,240,241</sup>. Merece destacar que en la NCDPB no suelen encontrarse



translocaciones que involucren al gen MLL, a pesar de la frecuente expresión de la proteína NG2 en la membrana de las células tumorales de estas neoplasias<sup>242</sup>.

Mediante estudios de perfiles de expresión génica se ha demostrado que la vía del factor nuclear  $\kappa$ B, y dos de sus dianas (Bcl2 e IRF4) están frecuentemente activadas de forma característica en la NCDPB<sup>197</sup>. En este sentido, se ha podido comprobar también que el inhibidor de proteasoma bortezomib y un inhibidor selectivo de NF- $\kappa$ B, son capaces de inducir parada del ciclo celular y apoptosis en la línea celular de NCDPB CAL-1<sup>197</sup>. A nivel molecular, Menezes et al. secuenciaron el exoma completo de tres pacientes con NCDPB; de acuerdo con los resultados que obtuvieron realizaron una resecuenciación dirigida a identificar mutaciones en 38 genes seleccionados en 25 muestras<sup>243</sup>. Así, encontraron mutaciones recurrentes en los genes TET2 (36%), ASXL1 (32%), NPM1 (20%), NRAS (20%), IKZF1 (20%), IKZF1-3 (20%), ZEB2 (16%), HOXB9 (4%), y UBE2G2 (4%). Al correlacionar estos hallazgos con los datos clínicos de la enfermedad, estos autores observaron que los pacientes con mutaciones en vías de metilación del ADN tenían una supervivencia significativamente más corta (11 meses vs. 79 meses)<sup>243</sup>. Otros estudios han identificado también mediante ultrasecuenciación del exoma completo la presencia de gran número de mutaciones genéticas previamente descritas en otras hemopatías malignas, y que involucran a genes como TET2 (57% de los casos)<sup>216,244</sup>, TP53 (14%)<sup>244</sup>, y ASXL1 (28%), además del gen ZRSR2 (57% de los pacientes)<sup>245</sup>. Este último gen -ZRSR2- es uno de los pocos genes que escapan a la inactivación del cromosoma X en mujeres, expresándose tanto el alelo materno como el paterno, hallazgo que ha hecho pensar que la razón por la que la NCDPB -al igual que ocurre en los síndromes mielodisplásicos- afecta mayoritariamente a varones se debería a que en los hombres sería necesaria una única mutación, mientras que en las mujeres se necesitaría una alteración bialélica<sup>246</sup>. Aunque las mutaciones de TET2 y TP53 sugieren la existencia de una relación genética entre la NCDPB y numerosas neoplasias mieloides, donde ambas alteraciones se observan con relativa frecuencia<sup>238,247</sup>, las neoplasias de CDp carecen de otras mutaciones recurrentes características de las LMA<sup>238</sup>.

**Tabla 2: Alteraciones genéticas recurrentes detectadas en NCDPB**

Referencia bibliográfica	Nº de pacientes	Técnica empleada	Alteraciones cromosómicas	Alteraciones moleculares	Perfil de expresión génica
Leroux et al. <sup>218</sup>	21	Citogen.	5q, 12p, 13q, 6q, 15q, monosomía 9	ND	ND
Lucioni et al. <sup>240</sup>	21	aHGC	Deleciones en 9p21.3, 13q13.1-q14.3, 12p13.2-p13.1, 13q11-q12	CDKN2A/CDKN2B, RB1, CDKN1B, LATS2	ND
Sapienza et al. <sup>197</sup>	27	PEG	ND	ND	IRF4 ↑, NFκB ↑, BCL2 ↑
Dijkman et al. <sup>198</sup>	13	PEG	ND	ND	HES6 ↑, RUNX2 ↑, FLT3 ↑
Alayed et al. <sup>216</sup>	16	SAR	ND	TET2	ND
Menezes et al. <sup>243</sup>	3/25	STE (n=3) SD (n=25)	ND	TET2, ASXL1, NPM1, NRAS, IKZF1-3, ZEB2, HOXB9, UBE2G2	ND
Kim et al. <sup>245</sup>	7	SAR	ND	TET2, TP53, ASXL1, IDH2, KRAS, ABL1, ARID1A, GNA13, U2AF1, SRSF2, IRF8, ZRSR2	ND

Citogen: citogenética convencional, ND: no se aportan datos, aHGC: arrays de hibridación genómica comparada, PEG: perfil de expresión génica, SAR: secuenciación masiva, STE: secuenciación del exoma completo, SD: secuenciación dirigida (adaptado de Ríaz et al. 2014<sup>ref. 214</sup>).

De forma similar, también se han descrito en la NCDPB alteraciones genéticas/moleculares específicas de numerosos genes que no se encuentran habitualmente afectados en otras hemopatías malignas, incluyendo genes de proteínas involucrados en la neurogénesis, y que se expresan de forma intensa en células neuronales<sup>198</sup>. Asimismo, en un estudio reciente basado en técnicas de ultrasecuenciación masiva, se han buscado mutaciones en los 50 genes más comúnmente alterados en cáncer, en muestras de pacientes con NCDPB<sup>238</sup>. Los resultados de este estudio muestran alteraciones recurrentes en cuatro de estos 50 genes: NRAS, IDH2, APC y ATM. Cabe señalar en este contexto que las mutaciones de los genes RAS y ATM se detectaron en 58% de los casos, distribuyéndose ambas de forma mutuamente excluyente. Estos hallazgos sugieren, por tanto, que dentro de la NCDPB podrían existir también subgrupos genéticos diferentes y bien definidos<sup>238</sup>.

En conjunto, los hallazgos genéticos y moleculares descritos hasta la fecha en pacientes con NCDPB, confirman la heterogeneidad de este grupo de hemopatías, habiéndose descrito múltiples mutaciones y alteraciones moleculares/genéticas en

general complejas e inespecíficas, que reflejan la existencia de una desregulación de varias vías, recogidas a modo de resumen en la tabla 2.

## 2.5. Tratamiento

### 2.5.1. Tratamiento actual de la NCDPB

Actualmente no existe ningún protocolo de tratamiento específico para pacientes con NCDPB, y debido a su baja frecuencia de presentación<sup>189,190,192</sup>, son pocos los ensayos clínicos prospectivos que hayan podido evaluar de forma fiable la superioridad de una pauta de tratamiento frente a otra. En nuestro conocimiento, en este momento solo se encuentran en vigor, y aún en fase de reclutamiento de pacientes, dos ensayos clínicos en los que se pretende evaluar en NCDPB la eficacia de conjugados anticuerpo-fármaco, a los que nos referiremos de forma más detallada más adelante (sección 2.5.3.).

Durante años, debido a la gran diversidad de formas de presentación clínica de la enfermedad (p. ej. tumor cutáneo aparentemente indolente vs. leucemia y linfoma) y a la dificultad diagnóstica asociada a la gran variabilidad de la edad de los pacientes y su estado general, los tratamientos administrados a pacientes con NCDPB han sido también muy heterogéneos, tanto en cuanto a los objetivos a alcanzar, como en lo que a fármacos/pautas terapéuticas se refiere. Así, habitualmente el tratamiento de estos pacientes en las series publicadas incluye, desde tratamiento sintomático o local (p. ej. radioterapia local de lesiones cutáneas aisladas), hasta regímenes de poliquimioterapia y quimioterapia intensiva seguidos de TAPH<sup>248,249</sup>.

Los regímenes poliquimioterápicos empleados en la fase de tratamiento de inducción a la remisión en las NCDPB han sido asimismo muy dispares, correspondiéndose en general con protocolos establecidos para otros subtipos de hemopatías malignas<sup>190,192,214,250</sup>. En este sentido, la elección del protocolo concreto a administrar en cada paciente con NCDPB se basa fundamentalmente en criterios clínicos, de forma que, en función de las características de cada caso, se han venido

administrando regímenes convencionales empleados para el tratamiento de: a) linfomas no Hodgkin (LNH) y que suelen incluir ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona (CHOP o tipo CHOP); b) protocolos característicos de LMA, basados en inducción con idarubicina, doxorubicina y etopósido, o; c) protocolos administrados generalmente a pacientes con LLA de alto riesgo, consistentes en la combinación de vincristina, daunorubicina, L-asparaginasa y prednisona o dosis hiperfraccionadas de ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y dexametasona en combinación con metotrexate y citarabina (hiperCVAD)<sup>190,192,214,250</sup>. En este contexto, cabe señalar que la mayoría de los protocolos internacionales más recientes para el tratamiento de adultos con LLA incluyen tratamiento profiláctico de enfermedad meníngea o del SNC<sup>251-253</sup>; esto se debe a que en la LLA, la frecuencia de recaídas en el SNC ha disminuido de forma drástica tras la utilización sistemática de esta estrategia de profilaxis neuromeníngea<sup>227,254</sup>. A nivel del SNC, el tratamiento de la enfermedad leptomeníngea se basa en la administración de quimioterapia intratecal con antimetabolitos (metotrexate y citarabina solos o en combinación con glucocorticoides solubles)<sup>253,255</sup> o en formulaciones de liberación prolongada –citarabina (AraC) liposomal<sup>256-</sup>, ya que la mayoría de los agentes quimioterápicos utilizados en los tratamientos sistémicos no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica por su elevado peso molecular. Más recientemente, se han introducido protocolos que incluyen antimetabolitos sistémicos (AraC o metotrexate) administrados a altas dosis con capacidad de pasar la barrera hematoencefálica, de modo similar al tratamiento administrado en pacientes con LNH-B agresivos<sup>257,258</sup>.

### 2.5.2. Respuesta al tratamiento y supervivencia

La respuesta a los tratamientos de quimioterapia intensiva referidos anteriormente es en general excelente, ya que la gran mayoría de los pacientes (~80%) alcanza remisión completa tras tratamiento de primera línea con intención curativa<sup>189-191</sup>, independientemente del protocolo administrado. Desgraciadamente la respuesta completa no es duradera, ya que invariablemente se produce una recaída rápida de

la enfermedad (en piel, tejidos blandos, y SNC y/o recaída sistémica) tras una mediana de  $\approx 8$  meses<sup>189,193,215,240</sup>. En la fase de recaída de la enfermedad, los pacientes desarrollan quimioresistencia<sup>209,259</sup> y dejan de responder, tanto a la terapia inicial como a protocolos de segunda línea, lo que desemboca en una fase leucémica fulminante y terminal, que acaba con la vida del paciente<sup>157,189</sup>. Esto se traduce en medianas de supervivencia cortas, generalmente inferiores a un año<sup>190-192,240</sup>, independientemente de la forma de presentación de la enfermedad<sup>189,190,192</sup>.

A pesar de todo lo anterior, cabe señalar que se ha observado una evolución más favorable entre pacientes tratados con regímenes de tipo LLA de alto riesgo vs. LMA o LNH<sup>189,190,211</sup>, por lo que la mayoría de las series más recientes apoyan el uso de esta modalidad terapéutica, aun en ausencia de ensayos clínicos randomizados que confirmen de forma definitiva el beneficio de la misma. En este sentido cabe señalar que, aunque la superioridad del tratamiento tipo LLA de alto riesgo es evidente, esto podría ser debido a que las respuestas favorables observadas en este tipo de tratamiento se han descrito principalmente en pacientes pediátricos<sup>211,212</sup>, en los que la enfermedad suele presentarse en su forma leucémica, en ausencia de afectación de la piel. Por todo ello, está aún por aclarar si el aparente efecto beneficioso del tratamiento es independiente o no de la edad y de la forma de presentación de la enfermedad.

Por otra parte, también se ha descrito una tasa de respuesta más favorable en pacientes sometidos a TAPH<sup>215,248,249,260</sup>. De hecho, la única opción que de forma sistemática ha demostrado asociarse a una supervivencia alargada de los pacientes con NCDPB, y a un mejor control de la enfermedad a largo plazo, es la del TAPH<sup>193,248</sup>, sobre todo si este se realiza en primera remisión completa y tras la administración de regímenes de acondicionamiento mieloablatoivo<sup>248</sup>. Sin embargo, esta opción no resulta factible en un porcentaje significativo de pacientes, debido a que la enfermedad suele presentarse en sujetos de edad avanzada y en asociación con importantes comorbilidades, además de no estar exenta de toxicidad, e incluso de la posterior recaída de la enfermedad, que llega a observarse en alrededor de un tercio de los

casos trasplantados<sup>248,260</sup>. En el momento actual, sigue sin aclararse si la eficacia del TAPH se debe al efecto injerto contra leucemia, o simplemente a la intensidad de los regímenes mieloablativos administrados de forma previa al trasplante, ya que también se han observado supervivencias más largas en enfermos que han recibido trasplante autólogo<sup>193,259,260</sup>. En el caso de los pacientes pediátricos no se recomienda el TAPH en primera remisión completa, ya que se ha observado que los niños tratados con protocolos tipo LLA de alto riesgo y profilaxis del SNC en la inducción, presentan mejor pronóstico que los adultos; en este sentido, en los pacientes pediátricos se considera que el TAPH debería contemplarse en 2ª remisión (completa), o ante la ausencia de una respuesta completa<sup>211</sup>.

### 2.5.3. Nuevos tratamientos dirigidos a la NCDPB

Recientemente se ha producido un nuevo fármaco (SL-401)<sup>261</sup> dirigido de forma específica al tratamiento de la NCDPB y que se encuentra en evaluación en un ensayo clínico de fase I (NCT02113982); se trata de una proteína de fusión recombinante, compuesta por la IL3 humana conjugada con la toxina de la difteria<sup>262</sup>, y cuya diana terapéutica es el receptor de la IL3 (CD123). Su mecanismo de acción consiste en la unión del dominio de la IL3 del SL-401 con su receptor, CD123; una vez unida la proteína a CD123, esta es internalizada, siendo el fragmento  $\alpha$  de la toxina de la difteria traslocado al citosol. Como consecuencia se produce inactivación de la síntesis de proteínas y muerte celular por apoptosis<sup>263,264</sup>. El empleo de SL-401 para el tratamiento de la NCDPB se fundamenta en la expresión elevada de CD123 en la membrana de las células tumorales de estos pacientes, mientras que el fármaco no afectaría a las células *stem* hematopoyéticas normales<sup>265</sup>.

Aunque en general las CDp neoplásicas se caracterizan por mostrar una expresión intensa de CD123, se han descrito algunos casos en los que la expresión del receptor de IL3 no es tan elevada<sup>190,220</sup>, lo que podría traducirse en una menor respuesta del tumor al tratamiento. Por otra parte, CD123 también se expresa en células normales como los monocitos y los precursores mieloides inmaduros<sup>266</sup>, lo que podría llevar

aparejado también efectos secundarios derivados de la posible toxicidad sobre estas poblaciones celulares normales.

A pesar de los resultados prometedores obtenidos en un modelo de ratón con heteroinjerto de células de NCDPB humanas<sup>267</sup> y la elevada tasa de remisiones obtenida en los ensayos clínicos con este nuevo fármaco<sup>261,268</sup>, por el momento, con este tratamiento, la supervivencia libre de recaída (mediana de 5 meses con un rango de 1 a 20 meses) y la supervivencia global observadas *in vivo*, no han sido superiores a las descritas con otros tratamientos poliquimioterápicos convencionales<sup>261</sup>. Sin embargo, al tratarse de una terapia dirigida, potencialmente con mejor tolerancia que los tratamientos intensivos recomendados actualmente para esta neoplasia, su administración podría estar especialmente indicada en aquellos pacientes que no son candidatos a recibir regímenes poliquimioterápicos con elevada toxicidad. Asimismo, este nuevo tratamiento podría resultar beneficioso como tratamiento de segunda línea, cuando la enfermedad no responde a los tratamientos convencionales, e incluso en la recaída, si se comprueba que las células patológicas siguen expresando CD123 de alta intensidad y siguen siendo sensibles *in vitro* al tratamiento con SL-401<sup>267</sup>. Debido a estas características y a la falta de un tratamiento efectivo para la enfermedad, SL-401 ha conseguido la designación de medicamento huérfano para la NCDPB tanto en Estados Unidos como en Europa<sup>269</sup>.

De forma similar a lo descrito para SL-401, en los últimos años se han producido también anticuerpos humanizados dirigidos frente a la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL3 (CD123)<sup>270</sup>, sin que por el momento se haya establecido ningún ensayo clínico específico en pacientes con NCDPB. En pacientes con LMA se ha demostrado que, pese a la unión específica del anticuerpo (CSL360) con CD123, este no induce actividad antileucémica en los pacientes, lo cual sugiere que el bloqueo funcional de CD123 como estrategia terapéutica es insuficiente<sup>270</sup>. Por este motivo, en la actualidad se ha modificado su región Fc para que, además de neutralizar la señalización mediada por CD123, pueda también amplificar la citotoxicidad dependiente de anticuerpo mediada por las células NK CD16<sup>+</sup> del propio individuo (ensayo clínico CSL362/JNJ-

56022473). En vista de los buenos resultados obtenidos en pacientes con LMA, el ensayo clínico en estos pacientes sigue adelante y podría empezar a testarse pronto en ensayos de fase II<sup>271,272</sup>.

Una tercera molécula en fase de ensayo clínico en pacientes con NCDPB es el conjugado anticuerpo-fármaco lorvotuzumab+mertansina (ensayo clínico NCT02420873). Esta nueva molécula consta de un conjugado de un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD56 (lorvotuzumab) y un agente citostático (mertansina). En este caso, las células tumorales deben ser positivas para CD56, como ocurre en la mayoría de los pacientes con NCDPB. Aunque podría tratarse de un tratamiento prometedor, en la actualidad estamos a la espera de los primeros resultados preliminares.

Cabe señalar que en los ensayos clínicos realizados en pacientes con NCDPB con ambas moléculas (SL-401 y lorvotuzumab+mertansina), la afectación (activa o mal controlada) del SNC constituye criterio de exclusión del ensayo. Dado que ninguno de los dos fármacos parece poder atravesar la barrera hematoencefálica, esta restricción limita de forma notable el empleo de estos tratamientos en pacientes en recaída, momento en el que >30% de los casos muestra afectación del SNC.



# Hipótesis de trabajo y objetivos



La neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica (NCDPB) constituye una hemopatía maligna muy poco frecuente, caracterizada desde el punto de vista clínico por presentar habitualmente infiltración cutánea y un curso muy agresivo. Hace unos 15 años se demostró que la contrapartida normal de esta leucemia es un precursor de célula dendrítica plasmocitoide, por lo que en la clasificación más reciente de la OMS de 2008 la NCDPB queda englobada dentro de las "leucemias mieloblásticas agudas y otras neoplasias relacionadas de precursores mieloides". Tras su asignación a la línea de CDp, se establecieron inicialmente una serie de criterios diagnósticos fenotípicos requeridos para la definición de esta entidad. A falta de marcadores específicos de línea de CDp en la gran mayoría de los casos, el diagnóstico fenotípico se ha basado en un patrón característico de expresión de CD123<sup>++</sup>/HLA-DR<sup>++</sup> en las células tumorales, junto a la coexpresión en las mismas de las moléculas CD56 y CD4, en ausencia de CD34 y de los marcadores CD13 y CD33, entre otros. De forma característica además, estas células carecen de marcadores específicos de línea de granulocito neutrófilo, monocito, linfocito T y célula B (cyMPO<sup>neg</sup>, CD14<sup>neg</sup>, cyCD3<sup>neg</sup>, CD19<sup>neg</sup>). Pronto se comprobó que estos criterios fenotípicos resultaban muy restrictivos, al observarse que en algunos casos las células tumorales expresaban -aunque parcialmente- CD34, así como CD13, CD33, y otros marcadores mieloides y linfoides T y B; además, en algunas NCDPB las células tumorales carecían también de CD4 y/o de CD56. Esta heterogeneidad fenotípica de las células tumorales de pacientes con NCDPB, se refleja también en una elevada heterogeneidad genética y clínica, observándose formas de NCDPB localizadas en piel o incluso asintomáticas en un primer momento y formas de comportamiento "linfomatoso", junto con otras de comportamiento "leucémico". Debido a esta heterogeneidad clínico-biológica, y a la ausencia de marcadores fenotípicos o genéticos/moleculares específicos de esta entidad, en ocasiones el diagnóstico diferencial entre NCDPB y otras hemopatías malignas representa un verdadero reto, pudiendo llegar a confundirse la NCDPB con otras hemopatías agudas, sobre todo con la leucemia mieloblástica aguda y otras hemopatías mieloides, pero también con neoplasias linfoides como el linfoma T/NK extranodal tipo nasal y otros

linfomas de células T maduras, en los que las células tumorales suelen infiltrar la piel y expresar CD4 y/o CD56.

En la mayoría de las hemopatías malignas, incluidas las neoplasias de células B y T y la leucemia mieloblástica aguda, la identificación y clasificación de la enfermedad se apoya en gran medida en el conocimiento de su contrapartida celular normal. Esto es debido a que buena parte de las características y del comportamiento biológico de la célula tumoral se asemeja a las de su contrapartida normal, en lo que a la línea celular y estadio madurativo se refiere<sup>273-275</sup>.

En el momento de iniciar este trabajo de tesis doctoral no se disponía de un modelo de referencia de contrapartida celular normal de la NCDPB, identificado como el precursor de CDp humana. La identificación en la MO de adultos sanos, dentro del compartimento de células CD34<sup>+</sup>, de precursores claramente comprometidos a línea de CDp, y la subsiguiente caracterización fenotípica y funcional de los distintos estadios madurativos desde este precursor medular hasta la CDp más madura de SP, constituiría por tanto un marco de referencia fundamental a la hora de definir de forma más precisa los criterios diagnósticos de NCDPB, y de interpretar mejor la heterogeneidad fenotípica de esta entidad. A su vez, el comportamiento clínico variable de la NCDPB podría estar condicionado por el grado de maduración del precursor de CDp en el que tiene origen el tumor, al igual que se ha observado en otras hemopatías. Para poder confirmar esta hipótesis resulta fundamental la comparación de las características de la CDp tumoral con las de los precursores normales de la MO en diferentes estadios de maduración. En caso de observarse una correspondencia entre ambas, las características del precursor normal de CDp de MO podrían aplicarse para clasificar la NCDPB, en función del grado de diferenciación en el que se encuentra detenida la célula tumoral, pudiendo este además, condicionar el comportamiento clínico (e incluso pronóstico) de la enfermedad.

Además de su posible relación con el estado de maduración de las células tumorales, el mal pronóstico general de los pacientes con NCDPB podría depender también de otros factores, como el patrón de diseminación de las células tumorales por

distintos órganos y tejidos del organismo, en especial por tejidos inmuno-privilegiados, que actúan como santuarios de la enfermedad, al ser inaccesibles a los tratamientos quimioterápicos sistémicos convencionales, como ocurre en otras hemopatías, especialmente en las leucemias agudas de precursores linfoides B y linfomas no Hodgkin B agresivos. Entre estos tejidos cabe señalar de forma muy especial el SNC. Nuestra hipótesis de partida asienta sobre la posibilidad de que las células tumorales de la NCDPB infiltren el SNC desde las fases iniciales de la enfermedad, siendo responsables de buena parte de las recaídas en SNC y/o sistémicas de esta neoplasia. Esta hipótesis se fundamenta, por un lado, en el hecho de que las recaídas en SNC -o en general la infiltración del SNC cuando la enfermedad reaparece tras haber alcanzado la remisión completa- son relativamente elevadas, y por otra parte, en que los pacientes que han sido tratados previamente con protocolos de quimioterapia de tipo LLA, en los que se administra profilaxis/tratamiento intratecal en el momento del diagnóstico, o bien aquellos que son sometidos a TAPH, tienen supervivencias más prolongadas. En el momento de abordar este objetivo en la presente tesis doctoral, se desconocía la verdadera incidencia de infiltración tumoral del SNC en la NCDPB, siendo su conocimiento especialmente relevante por las implicaciones terapéuticas que de ello podrían derivarse.

De acuerdo con estos antecedentes, en el presente trabajo doctoral nos propusimos como **objetivo general** profundizar en el conocimiento de las características clínicas, biológicas y fenotípicas de la NCDPB a través del desarrollo de tres **objetivos específicos**:

1. Identificar los precursores de CDp de médula ósea de adultos sanos y analizar en detalle las características morfológicas, fenotípicas, y funcionales de estas células a lo largo de la maduración normal, desde el precursor CD34<sup>+</sup> hasta la CDp más madura de sangre periférica, con el fin de establecer una referencia de normalidad para la posterior caracterización de NCDPB.

2. Relacionar el estadio madurativo de la célula tumoral de la NCDPB con las características clínicas y biológicas de la enfermedad y su comportamiento clínico y pronóstico.
3. Establecer la incidencia de infiltración del sistema nervioso central en la NCDPB al diagnóstico, y determinar el potencial beneficio del tratamiento intratecal en estos pacientes.

Materiales,  
métodos y  
resultados





En esta sección de la memoria se describen los pacientes, materiales y métodos empleados, así como los resultados obtenidos, en relación con cada uno de los tres objetivos concretos planteados, mediante la inclusión de los artículos científicos originales publicados como consecuencia del trabajo doctoral realizado. Cada uno de los artículos está precedido de un breve resumen en castellano que facilita una revisión rápida de la información contenida en los mismos.

## **Artículo 1:** “Caracterización fenotípica, morfológica y funcional de los estadios madurativos de la célula dendrítica plasmocitoide en médula ósea normal de adultos”

**Objetivo.** Estudios previos han demostrado que las diferentes subpoblaciones de células dendríticas (CDs) se originan a partir de un progenitor CD34<sup>+</sup> de médula ósea (MO), aunque se desconoce la secuencia concreta de maduración que siguen los precursores de la célula dendrítica plasmocitoide (CDp). El conocimiento más preciso y profundo de los cambios (biológicos) asociados a la maduración de esta línea celular podría sentar las bases para, por un lado, conocer y aprovechar de forma más eficiente el potencial terapéutico de la CDp y, por otra parte, contribuir a una mejor identificación y caracterización de la neoplasia de CDp. Este trabajo tiene como objetivo caracterizar fenotípica, morfológica y funcionalmente los precursores de célula dendrítica plasmocitoide (pre-CDp) de médula ósea normal (MON) de adultos, a lo largo de sus distintos estadios de maduración.

**Pacientes, materiales y métodos.** En conjunto, caracterizamos fenotípicamente un total de 45 muestras de MON mediante citometría de flujo multiparamétrica, empleando paneles de anticuerpos monoclonales en combinaciones de seis fluorescencias; las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCanto I. Además, en 7 de estas muestras se purificaron los pre-CDp de 3 estadios madurativos distintos empleando un citómetro de flujo FACSARIA. En cada una de las fracciones madurativas de pre-CDp purificadas se realizaron los siguientes estudios: a) caracterización morfológica en

situación basal y tras cultivo en presencia de IL3 o de IL3+CpG-ODN, empleando tinción con colorantes panópticos y visualización en un microscopio óptico; b) determinación de su capacidad para secretar IFN $\alpha$  tras estimulación *in vitro* con IL3+CpG-ODN; c) análisis de su capacidad endocítica, evaluando su capacidad para captar dextrano conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), mediante CMF y; d) análisis de la capacidad de dichas células para estimular linfocitos T alogénicos, función evaluada por CMF empleando diacetato de carboxifluoresceína, succinimidil éster (CFDA,SE).

**Resultados.** En todas las muestras de MON estudiadas se identificaron tres estadios madurativos de pre-CDp de acuerdo a la expresión de CD34, HLA-DR, CD123 y CD45; desde el estadio más inmaduro al más maduro, estos se definieron por los siguientes perfiles fenotípicos: CD34<sup>++</sup>, HLA-DR<sup>++/+++</sup>, CD123<sup>++</sup>, CD45<sup>+/+</sup> (estadio I); CD34<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+/+</sup>, CD123<sup>++/+++</sup>, CD45<sup>+/+</sup> (estadio II) y; CD34<sup>neg</sup>, HLA-DR<sup>++</sup>, CD123<sup>++/+++</sup>, CD45<sup>++</sup> (estadio III). En términos generales, la expresión de moléculas presentadoras de antígeno se mantuvo elevada a lo largo de toda la maduración, mientras que la positividad para moléculas asociadas a CDp como CD304 o CD85j aumentaba de forma progresiva desde las fases más tempranas de la diferenciación (estadio I) a los pre-CDp más maduros de MO (estadio III). Cabe señalar que en el estadio más inmaduro los pre-CDp expresaban marcadores clásicamente asociados a línea mieloide como CD11c, CD13 y/o CD33. Asimismo, la molécula coestimuladora CD86 se expresaba en los precursores más inmaduros de línea de CDp, siendo indetectable en las CDp más maduras; por el contrario, la expresión de CD40 estaba restringida al estadio de pre-CDp más maduro (estadio III). El antígeno cutáneo linfocitario (CLA) se expresaba a lo largo de todos los estadios madurativos, siendo particularmente evidente su expresión en el estadio I.

El análisis morfológico de las subpoblaciones purificadas de pre-CDp reveló un aumento progresivo de la indentación nuclear y una disminución de la basofilia citoplasmática con la maduración. Solo se observaron prolongaciones citoplasmáticas en pre-CDp cultivados *in vitro* en presencia de IL3 y CpG. Respecto a los estudios funcionales, comprobamos que la única población de pre-CDp capaz de secretar IFN $\alpha$  tras estimulación *in vitro* era la integrada por las CDp más maduras, mientras que la de

mayor capacidad endocítica correspondía a la subpoblación más inmadura. Además, tras el ensayo de proliferación de linfocitos T alogénicos, comprobamos que tanto la población intermedia como la más madura (estadios II y III) eran capaces de inducir la proliferación de los linfocitos T presentes en el cultivo, mientras que la subpoblación de pre-CDp más inmadura prácticamente no inducía ningún efecto estimulador de la proliferación de los linfocitos T.

**Conclusiones.** Nuestros resultados permiten concluir que en la MO de adultos sanos existen al menos tres estadios de diferenciación de CDp, con características fenotípicas, morfológicas y funcionales distintas. Además, nuestros hallazgos muestran que los pre-CDp más inmaduros coexpresan marcadores asociados a CDp y marcadores mieloides típicamente atribuidos a la CDc, junto con características fenotípicas asociadas a la generación de tolerancia inmune. Finalmente, proporcionan un modelo de referencia para la identificación y caracterización fenotípica de la contrapartida neoplásica de los pre-CDp.



## Immunophenotypical, morphologic, and functional characterization of maturation-associated plasmacytoid dendritic cell subsets in normal adult human bone marrow

Lourdes Martín-Martín, Julia Almeida, Pilar María Hernández-Campo, María Luz Sánchez, Quentin Lécrevisse, and Alberto Orfao

**BACKGROUND:** Information about maturation of plasmacytoid dendritic cell precursors (pre-pDCs) in normal bone marrow (BM) remains limited.

**STUDY DESIGN AND METHODS:** Immunophenotypical, morphologic, and functional changes associated with maturation of pre-pDCs were analyzed in adult normal human BM (n = 45).

**RESULTS:** Three pre-pDC maturation stages, with an increasingly higher degree of maturity, were systematically identified: CD34<sup>++</sup>/HLA-DR<sup>++</sup>/CD123<sup>++</sup>/CD45<sup>++</sup> (Stage I), CD34<sup>++</sup>/HLA-DR<sup>++</sup>/CD123<sup>++</sup>/CD45<sup>++</sup> (Stage II), and CD34<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>++</sup>/CD123<sup>++</sup>/CD45<sup>++</sup> (Stage III) cells. Lymphoid- and early myeloid-associated molecules, as well as CD86, were coexpressed in Stage I pre-pDCs, being down regulated afterward. CD304 and CD85j appeared in Stage I, progressively increasing their levels thereafter. Interestingly, cutaneous lymphocyte-associated antigen was heterogeneously expressed throughout the maturation, particularly in Stage I pre-pDCs. The morphologic appearance of Stage I pre-pDCs was consistent with their undifferentiated stage, while Stage II/III cells showed morphologic features of more differentiated cells. From the functional point of view, only Stage II and Stage III pre-pDCs were capable of inducing allogeneic T-cell proliferation, the later subset also showing interferon- $\alpha$  secretion; in contrast, Stage I pre-pDCs showed the highest endocytic ability.

**CONCLUSION:** In summary, three maturation stages of pre-pDCs can be identified in adult normal BM, which show unique phenotypical, morphologic, and functional characteristics; these results provide a frame of reference for a better understanding of pDC malignancies.

Dendritic cells (DCs) are the most powerful professional antigen-presenting cells, which are able to present processed antigens to naïve T cells and to induce antigen-specific immune responses versus tolerance;<sup>1-5</sup> so far, the exact factors determining the type of T-cell response—immunogenic versus tolerogenic—remain unknown, although both the subtype of DCs involved in the interaction with T cells and their stage of maturation<sup>6</sup> could play a key role in this regard. Because of this, comprehensive and detailed knowledge about the maturation pathways of different subsets of DCs at distinct locations is required.

**ABBREVIATIONS:** APC = allophycocyanin; BDB = Becton Dickinson Biosciences; BM = bone marrow; CFDA-SE = 5,6-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester; CLA = cutaneous lymphocyte-associated antigen; Cy7 = cyanin 7; DC(s) = dendritic cells; MPO = myeloperoxidase; ODN = oligodeoxynucleotides; PB = peripheral blood; pDC(s) = plasmacytoid dendritic cell(s); PerPC = peridinin chlorophyll; PHA = phytohemagglutinin; pre-DC(s) = dendritic cell precursor(s); pre-pDC(s) = plasmacytoid dendritic cell precursor(s).

From the Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer/IBMCC (CSIC-USAL), and the Servicio de Citometría & Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.

Address reprints requests to: Alberto Orfao, MD, PhD, Laboratorio 11, Centro de Investigación del Cáncer, Av. Universidad de Coimbra s/n, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain; e-mail: orfao@usal.es.

The first two authors have equally contributed to this work and the two should be considered as first authors.

Received for publication March 11, 2008; revision received February 2, 2009; and accepted February 6, 2009.

doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02170.x

TRANSFUSION 2009;49:1692-1708.

Until now, human DCs have been identified and characterized in peripheral blood (PB),<sup>7</sup> lung,<sup>8</sup> thymus,<sup>9</sup> dermis,<sup>10</sup> tonsils,<sup>11</sup> spleen,<sup>12</sup> and lymph nodes<sup>13</sup> but, to our knowledge, there is little information about the characteristics of bone marrow (BM) DC precursors (pre-DCs).<sup>14,15</sup> Previous studies have shown that different subpopulations of DCs (e.g., myeloid DCs, plasmacytoid DCs, monocyte-derived DCs, and Langerhans cells) originate from CD34+ progenitor cells in the BM, but the ontogeny and specific differentiation pathways of each DC subset still remain largely unknown.<sup>16</sup> Accordingly, no information exists regarding the BM maturation pathways of both human myeloid and monocyte-derived DCs. In turn, although some reports have focused on the analysis of BM plasmacytoid DCs (pDCs), these studies have been performed mostly on murine models,<sup>17,18</sup> and mouse pDCs are significantly different from their human counterpart.<sup>19</sup> Further knowledge on the characteristics of maturing human BM pre-DCs may enable us to harness the maximum potential of DCs for immunointerventions.

In addition to the potential therapeutic use of specific subsets of DCs, detailed characterization of DC subpopulations from their more immature BM precursors to the more mature cell compartments may also contribute to a better identification and characterization of the recently described neoplasias of DCs,<sup>20-25</sup> included in the WHO classification as blastic/aggressive (CD4+/CD56+) NK cell lymphomas/leukemias<sup>26</sup> and renamed as agranular CD4+/CD56+ hematodermic neoplasm in the WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas.<sup>27</sup>

In this study, we analyze the immunophenotypical, morphologic, and functional features of plasmacytoid dendritic cell precursors (pre-pDCs) from normal adult human BM. Our results show that different maturation-associated subsets of pre-pDCs display distinct phenotypical and functional characteristics, providing a frame of reference for a better identification and understanding of both normal and neoplastic pDCs.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples

A total of 45 BM aspirate samples—mean volume of  $2.8 \pm 0.5$  mL—from an identical number of adult healthy volunteers ( $n = 45$ ) were collected and placed into tubes (Vacutainer, Becton Dickinson Biosciences [BDB], San Jose, CA) containing ethylenediaminetetraacetate (EDTA) and lithium heparin as anticoagulant. The mean age of the individuals—30 (67%) males and 15 (33%) females—was  $58 \pm 17$  years (range, 28-86 years; median, 58 years). The study was approved by the ethics committee of the Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer/IBMCC (Salamanca, Spain) and all samples were obtained according to its

recommendations, after informed consent had been given by each individual.

### Immunophenotypical analyses

Antigen expression was analyzed on whole BM samples by multiparameter flow cytometry using six-color combinations of monoclonal antibodies (MoAb): fluorescein isothiocyanate (FITC)/phycoerythrin (PE)/peridinin chlorophyll protein (PerCP)/PE-cyanin 7 (PE-Cy7)/allophycocyanin (APC)/APC-Cy7. Sample aliquots were stained using a well-established immunofluorescence stain-lyse-and-then-wash procedure, previously described in detail.<sup>28</sup> The following MoAbs were constantly present in all sample aliquots, to allow the identification of pre-pDCs and their maturation stages: anti-HLA-DR-PerCP (clone L243, BDB), CD34-PE-Cy7 (clone 8G12, BDB), CD123-APC (clone AC145, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), and CD45-APC-Cy7 (clone 2D1; BDB). Further immunophenotypic characterization of the different maturation-associated subpopulations of pre-pDCs was performed by adding a large panel of FITC-/PE-conjugated MoAbs, whose source and specificity are shown in detail in Table 1. For the six-color combination in which reactivity for unconjugated anti-HLA-DP MoAb was assessed, indirect labeling was performed first by sequentially staining with the anti-HLA-DP MoAb and FITC-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin F(ab)<sub>2</sub> antibody fragments (Dako, Glostrup, Denmark) and washing twice in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.6) to remove the residual soluble secondary antibody; labeling with the directly conjugated MoAb was then performed. Combined staining for surface antigens and intracellular molecules (B12, CD79a, G4, G5, carboxypeptidase A, eosinophil peroxidase, eosinophil major basic protein, myeloperoxidase [MPO], lysozyme, and TLR9) was performed using a reagent kit (Fix and Perm, Invitrogen, Carlsbad, CA), strictly following the recommendations of the manufacturer. For each sample, an aliquot was stained with anti-HLA-DR-PerCP, CD34-PE-Cy7, CD123-APC, and CD45-APC-Cy7, in the absence of any FITC- or PE-conjugated MoAb, and processed in parallel in an identical way, as a negative control.

Acquisition of immunophenotypical data was performed immediately after completion of sample preparation, in a flow cytometer (FACSCanto, BDB) using its accompanying software program (FACSDiva, BDB). Appropriate single versus multicolor comparisons were performed before data acquisition to ensure that fluorescence compensation had no impact on the measurement of fluorescence intensity. To improve the sensitivity of the analysis of pre-pDCs, data acquisition was performed in two consecutive steps. In the first step, information was collected on 30,000 events corresponding to all nucleated

**TABLE 1. MoAb used for the analysis of protein expression on different maturation-associated subsets of BM pre-pDCs**

Specificity	Fluorochrome conjugate	Targeted molecule	Clone	Source
HLA molecules	HLA-ABC FITC HLA-DP PURE HLA-DQ FITC HLA-DR PerCP	HLA-ABC HLA-DP HLA-DQ HLA-DR	B9.12.1 B7/21 TÜ169 L243	Immunotech* BDB† PharMingen‡ BDB†
Costimulatory and signaling molecules	CD2 FITC CD4 FITC CD4 PerCP CD40 PE CD80 PE CD86 PE	LFA-2 CD4 coreceptor CD4 coreceptor Bp50 B7 B7-2	S5.2 SK3 SK3 MAB89 L307.4 IT2.2	BDB† BDB† BDB† Immunotech* BDB† PharMingen‡
Adhesion molecules	CD11a FITC CD11c PE CD54 PE CD56 PE CD62L PE CD64 PE	AlphaL integrin chain AlphaM integrin chain ICAM-1 NCAM LAM-1 FCR I	G-25.2 B-ly6 LB-2 NCAM16.2 SK11 22	BDB† BDB† BDB† BDB† BDB† Immunotech*
Immunoglobulin receptors	CD13 PE CD14 PE CD33 PE CD1a PE CD1b FITC CD1c PE CD85j FITC CD209 FITC CD275 PE CD303 FITC CD304 PE L-SECTin CD284 PE cyCD289 PE cyCD79a PE CD79b PE CD22 PE	APN LPS-R gp67 R4 R1 R7 ILT/LIR family DC-SIGN B7-H2 C-type lectin Neuropilin 1 CLEC-4G TLR-4 toll-like receptor TLR-9 toll-like receptor Immunoglobulin $\alpha$ Immunoglobulin $\beta$ BL-CAM	WM15 MøP9 P67.6 NA1/34 M-T101 AD5-8E7 GHI/75 DCN46 2D3/B7-H2 AC144 AD5-17F6 SOTO1 HTA125 Eb72-1665 HM57 CB3-1 S-HCL-1	BDB† BDB† BDB† Dako§ PharMingen‡ Milttenyi Biotech   PharMingen‡ PharMingen‡ PharMingen‡ Milttenyi Biotech   Milttenyi Biotech   Provided by A.L. Corbi eBioscience¶ eBioscience¶ Dako§ Immunotech* BDB†
B-cell-associated markers	cyLysozyme cyMPO cyB12 cyG4 cyG5 cyCarboxypeptidase A cyEosinophil major basic protein cyEosinophil peroxidase	Lysozyme MPO Pro and mature $\alpha/\beta$ -tryptase Pro and mature $\alpha/\beta$ -tryptase Mature $\alpha/\beta$ -tryptase CPA Eosinophil major basic protein Eosinophil peroxidase	EC 3.2.2.17 MPO-7 B12 G4 G5 AHE-2 AHE-1	Dako§ Dako§ Provided by L.B. Schwartz Provided by L.B. Schwartz Provided by L.B. Schwartz Provided by A.F. Walls BDB† BDB†
Myelomonocytic-associated enzymes	cyB12 cyG4 cyG5 cyCarboxypeptidase A cyEosinophil major basic protein cyEosinophil peroxidase	Lysozyme MPO Pro and mature $\alpha/\beta$ -tryptase Pro and mature $\alpha/\beta$ -tryptase Mature $\alpha/\beta$ -tryptase CPA Eosinophil major basic protein Eosinophil peroxidase	EC 3.2.2.17 MPO-7 B12 G4 G5 AHE-2 AHE-1	Dako§ Dako§ Provided by L.B. Schwartz Provided by L.B. Schwartz Provided by L.B. Schwartz Provided by A.F. Walls BDB† BDB†
Mast cell-associated enzymes	cyB12 cyG4 cyG5 cyCarboxypeptidase A cyEosinophil major basic protein cyEosinophil peroxidase	Lysozyme MPO Pro and mature $\alpha/\beta$ -tryptase Pro and mature $\alpha/\beta$ -tryptase Mature $\alpha/\beta$ -tryptase CPA Eosinophil major basic protein Eosinophil peroxidase	EC 3.2.2.17 MPO-7 B12 G4 G5 AHE-2 AHE-1	Dako§ Dako§ Provided by L.B. Schwartz Provided by L.B. Schwartz Provided by L.B. Schwartz Provided by A.F. Walls BDB† BDB†
Eosinophil-associated enzymes	CD45 APC-Cy7 CD45 Pacific Blue CD45RA FITC CD45RO PE CD25 PE CD116 FITC CD117 PE CD123 APC CD126 PE CD127 PE CD127 Alexa Fluor 647 CD181 PE CD182 PE CD184 PE CD195 PE CD197 PE	CD45 CD45 CD45RA isoform CD45RO isoform IL-2R alpha chain GM-CSF receptor alpha chain c-KIT IL-3R alpha chain IL-6R alpha chain IL-7R alpha chain IL-7R alpha chain IL-8R alpha chain/CXCR1 IL-8R beta chain/CXCR2 CXCR4 CCR5 CCR7 NG2	2D1 T29/33 L48 UCHL1 M-A251 M5D12 YB5.B8 AC145 M91 R34.34 hIL-7R-M21 5A12 6C6 12G5 2D7/CCR5 150503 7.1	BDB† Dako BDB† BDB† PharMingen‡ BDB† BDB† Milttenyi Biotech   Immunotech* Immunotech* PharMingen‡ BDB† BDB† BDB† BDB† R&D Systems** Immunotech*
CD45 antigen	CD45 APC-Cy7 CD45 Pacific Blue CD45RA FITC CD45RO PE CD25 PE CD116 FITC CD117 PE CD123 APC CD126 PE CD127 PE CD127 Alexa Fluor 647 CD181 PE CD182 PE CD184 PE CD195 PE CD197 PE	CD45 CD45 CD45RA isoform CD45RO isoform IL-2R alpha chain GM-CSF receptor alpha chain c-KIT IL-3R alpha chain IL-6R alpha chain IL-7R alpha chain IL-7R alpha chain IL-8R alpha chain/CXCR1 IL-8R beta chain/CXCR2 CXCR4 CCR5 CCR7 NG2	2D1 T29/33 L48 UCHL1 M-A251 M5D12 YB5.B8 AC145 M91 R34.34 hIL-7R-M21 5A12 6C6 12G5 2D7/CCR5 150503 7.1	BDB† Dako BDB† BDB† PharMingen‡ BDB† BDB† Milttenyi Biotech   Immunotech* Immunotech* PharMingen‡ BDB† BDB† BDB† BDB† R&D Systems** Immunotech*
Cytokine receptors	CD181 PE CD182 PE CD184 PE CD195 PE CD197 PE 7.1 PE CD3 APC-Cy7 CD34 PE-Cy7 CD36 FITC CD38 PE CD90 FITC CD99 FITC CLA FITC	IL-8R alpha chain/CXCR1 IL-8R beta chain/CXCR2 CXCR4 CCR5 CCR7 NG2 CD3 epsilon chain gp105-120 GPIIb T10 Thy-1 CD99R CLA	5A12 6C6 12G5 2D7/CCR5 150503 7.1 SK7 8G12 FA6.152 HB7 5E10 TÜ12 HECA-452	BDB† BDB† BDB† BDB† R&D Systems** Immunotech* BDB† BDB† Immunotech* BDB† PharMingen‡ PharMingen‡ BDB†
Other antigens	7.1 PE CD3 APC-Cy7 CD34 PE-Cy7 CD36 FITC CD38 PE CD90 FITC CD99 FITC CLA FITC	NG2 CD3 epsilon chain gp105-120 GPIIb T10 Thy-1 CD99R CLA	7.1 SK7 8G12 FA6.152 HB7 5E10 TÜ12 HECA-452	Immunotech* BDB† BDB† Immunotech* BDB† PharMingen‡ PharMingen‡ BDB†

\* Immunotech, Marseille, France.

† Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA.

‡ PharMingen, San Diego, CA.

§ Dako A/S, Glostrup, Denmark.

|| Milttenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany.

¶ eBioscience, San Diego, CA.

\*\* R&amp;D Systems, Minneapolis, MN.

cy = cytoplasmic.

cells present in the sample; in the second step, information was acquired and stored through an electronic live gate, exclusively for those HLA-DR<sup>hi</sup> events. In this latter step, a minimum of  $1.5 \times 10^5$  to  $2 \times 10^5$  HLA-DR<sup>hi</sup> cells were measured per sample aliquot.

For data analysis, software programs were used (FACSDiva and INFINICYT, Cytognos SL, Salamanca, Spain). The gating strategy followed to identify pre-pDCs and their different maturation stages is depicted in Fig. 1. The intensity of expression of each antigen analyzed was evaluated after specifically gating for each maturation-associated subpopulation of BM pre-pDCs in terms of mean fluorescence intensity (MFI)—expressed in arbitrary relative linear units scaled from 0 to 262,144—obtained after subtracting the MFI of the corresponding negative control.<sup>29</sup> The following arbitrary codes were then used to translate the intensity of expression of each antigen in a semiquantitative scale: negative, MFI of between 0 and 500; dim+, MFI of between 500 and 1000; +, MFI of between 1000 and 5000; +/++, MFI of between 5000 and 10,000; ++, MFI of between 10,000 and 50,000; ++/++, MFI of between 50,000 and 100,000; and +++, MFI more than 100,000.

#### Fluorescence-activated cell sorting of the different maturation-associated subpopulations of BM pre-pDCs

Purification of each maturation-associated subpopulation of pre-pDCs was performed in a subset of seven normal BM samples using a flow cytometer (FACSaria, BDB). Pre-pDC subsets were isolated according to the following immunophenotypic characteristics: 1) CD34<sup>++</sup>/HLA-DR<sup>++</sup>/+++/CD123<sup>++</sup>/CD45<sup>++</sup> events; 2) CD34<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>++</sup>/+++/CD123<sup>++</sup>/+++/CD45<sup>++</sup>; and 3) CD34<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>++</sup>/CD123<sup>++</sup>/+++/CD45<sup>++</sup> cells. The purity of each of the three subsets of fluorescence-activated cell-sorted pre-pDCs was constantly more than 90%.

#### Morphologic characterization of the different subpopulations of BM pre-pDCs

Morphologic characterization of the fluorescence-activated cell-sorted subpopulations of BM pre-pDCs from three BM samples was assessed in cytopins (Shandon, Southern Products, Sewickly, UK) prepared according to well-described methods— $1 \times 10^4$  purified cells in 100  $\mu$ L of PBS containing 2 mmol/L EDTA and 0.5% (w/v) bovine serum albumin—and stained with May-Grünwald-Giemsa, using a conventional optical microscope (BX41, Olympus, Hamburg, Germany).

#### Endocytic activity assays

The ability of the different cell populations analyzed to capture antigens was measured using a conventional

dextran-FITC uptake assay. For this purpose, five whole BM samples were incubated in PBS containing 0.5 mg/mL dextran-FITC (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) for 1 hour both at 37°C (test sample aliquots) and at 4°C (control sample aliquot). After being washed three times with cold PBS ( $1000 \times g$  for 5 min), cells were stained with the following combination of MoAb, aimed at the simultaneous identification of T lymphocytes (negative control cells), monocytes (positive control cells), CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells (HPCs) other than pre-pDCs, and the different subsets of pre-pDCs: CD14-PE, HLA-DR-PerCP, CD34-PE-Cy7, CD123-APC, CD3-APC-Cy7, and CD45-Pacific Blue (Table 1). Stained samples were measured in a flow cytometer (FACSCanto II, BDB) and results are expressed as dextran-FITC MFI values.

#### Evaluation of interferon- $\alpha$ secretion

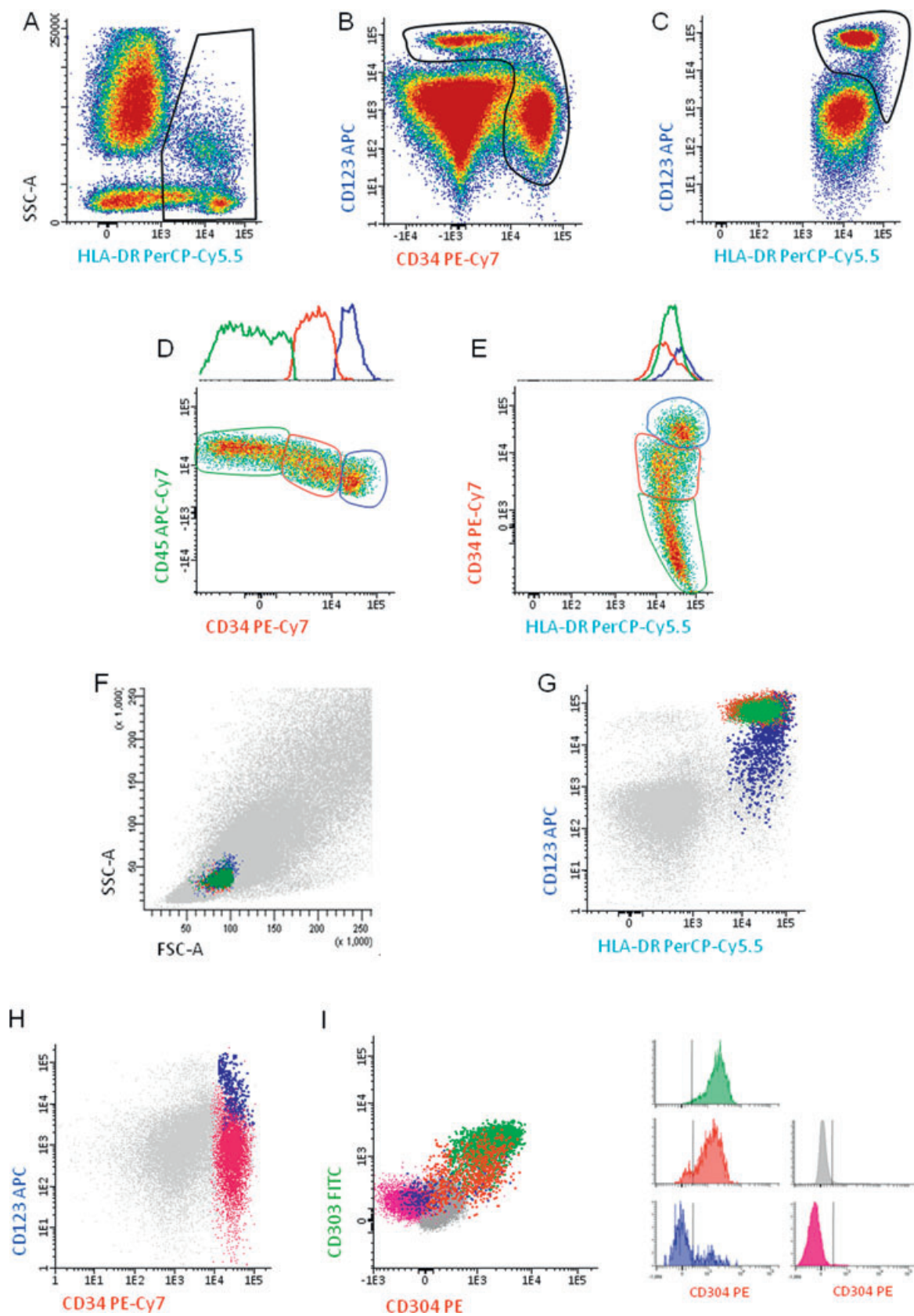
Each of the three maturation-associated subsets of purified pre-pDCs from three BM samples was cultured in RPMI 1640, supplemented with 10% fetal calf serum, 1.5 mmol/L L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin. Identical numbers of cells from each of the three subsets were incubated at 37°C in 96-well plates in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> (final volume of 200  $\mu$ L/well), in the presence of interleukin (IL)-3 (10 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN) and CpG oligodeoxynucleotides (ODN 2336, Class A; 6  $\mu$ g/mL; Coley Pharmaceutical Group, Wellesley, MA). In all cases, cells cultured in parallel with IL-3, but in the absence of CpG ODN, were used as controls. The number of cultured cells ranged from 2750 to 13,500 per cell subset. After an incubation period of 24 hours, supernatants from all wells were harvested and stored at -80°C, until analyzed for the presence of soluble interferon (IFN)- $\alpha$ ; adherent cells were also collected and processed as described below.

Soluble levels of IFN- $\alpha$  were measured using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Human Interferon alpha serum sample ELISA kit, PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ) on three independent samples, strictly following the recommendations of the manufacturer for the high-sensitivity protocol (lower sensitivity level of 10 pg/mL). ELISA plates were read using a multifunctional reader (Ultra Evolution, Tecan, Toronto, Ontario, Canada) at a 450-nm excitation wavelength.

#### Allogeneic T-cell proliferation assays

The ability of the different subsets of pre-pDCs to induce T-cell proliferation was measured ( $n = 2$ ), using a slightly modified 5,6-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDA-SE)-based assay (Vybrant CFDA-SE Cell Tracer Kit, Invitrogen), according to well-established





**Fig. 1.** Gating strategy followed to identify the three subsets of pre-pDCs present in adult normal BM. (A–E) Sequential gating strategy used to identify the whole pre-pDC population (A–C) and its three different maturational stages (D and E) detected in normal BM from two representative samples: BM cells were first gated according to their positivity for HLA-DR (A); in a second step both CD34<sup>+</sup> and CD123<sup>high</sup> cells were selected—these latter cells included CD34<sup>–</sup> cells—(B); and finally only those cells showing high levels of CD123 were selected as pre-pDCs, the discarded cells corresponding to non-pre-pDC CD34<sup>+</sup> HPCs (C). In D and E, the subpopulation gated with the blue lines represents Stage I pre-pDCs, red lines delimit Stage II pre-pDCs, and green lines define Stage III pre-pDCs. The light scatter pattern and the differential expression of HLA-DR and CD123 of the three maturation-associated subpopulations of pre-pDCs present in normal adult BM and identified using the gating strategy described above (A–E) are shown in F and G, respectively: blue dots correspond to those pre-pDCs (Subpopulation I) showing the more immature immunophenotypic characteristics (CD34<sup>++</sup>/HLA-DR<sup>++</sup>/+++ /CD123<sup>++</sup>/CD45<sup>++</sup>); pre-pDCs with intermediate immunophenotypic features (CD34<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>++</sup>/+++ /CD123<sup>++</sup>/+++ /CD45<sup>++</sup>, Subpopulation II) are painted in red, the more mature pre-pDCs (CD34<sup>–</sup>/HLA-DR<sup>++</sup>/CD123<sup>++</sup>/+++ /CD45<sup>++</sup>, Subpopulation III) are depicted in green; all remaining BM cells, corresponding to non-pre-pDCs, are displayed in gray. Differences in CD123 expression between the early committed pre-pDCs and CD34<sup>+</sup> HPCs (fuchsia dots) are shown in H. (I) Illustration of CD304 and CD303 expression on Stage I pre-pDCs, CD34<sup>+</sup> progenitors other than Stage I pre-pDCs, negative control (B lymphocytes)—gray dots—and positive control (Stage II and III pre-pDCs). Histograms for CD304 allow a better visualization of the different intensity of expression for CD304 among the different maturation-associated subsets of pre-pDCs, CD34<sup>+</sup> progenitor cells, and B lymphocytes (dotted lines correspond to the cutoff value for positivity in each histogram).

procedures.<sup>30</sup> Briefly, normal PB mononuclear cells (MNCs) isolated from heparinized venous blood of a healthy donor, by density-gradient centrifugation (Biocoll separating solution, Biochrom AG, Berlin, Germany) were resuspended in PBS supplemented with 0.1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and labeled with CFDA-SE at a final concentration of 0.5  $\mu\text{mol/L}$  /  $1 \times 10^6$  cells. After an incubation period of 5 minutes at room temperature, in the darkness, the staining reaction was quenched by adding ice-cold RPMI 1640 at a 1:3 dilution, followed by two washes with the same medium. CFDA-SE-stained MNCs were then seeded in 96-well culture plates at  $2 \times 10^5$  cells/well either alone (negative control) or mixed with each of the purified BM pre-pDC subsets at 1:10 pre-pDC/PBMNC ratio—isolated from another donor and with unlabeled total MNCs collected from the same BM sample (at 1:1 BM MNC/PBMNC ratio)—in 200  $\mu\text{L}$  of complete medium supplemented with IL-3, as described above. As a positive control, CFDA-SE-stained PBMNCs were also stimulated with 1.25  $\mu\text{g/mL}$  phytohemagglutinin (PHA; Invitrogen). Cells for each condition were seeded at least in duplicate/triplicate wells. On Day +5 of culture at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, cells from each well were harvested, stained with saturating concentrations of CD25-PE (BDB), CD4-PerCPy5.5 (BDB), and CD127-Alexa Fluor 647 (BDB; Table 1) and analyzed by flow cytometry. Data analysis was performed using a software program (Paint-A-Gate, BDB), and expressed as a percentage of total proliferating cells reached on Day 5: percentage of cells within both the CD4<sup>+</sup> and the CD8<sup>+</sup> PB T-cell subsets that had a significantly reduced CFDA-SE intensity in comparison to unstimulated control cells (parent generation), together with high expression of CD25 and CD127, after subtract-

ing the background corresponding to the negative control (nonstimulated CFDA-SE-stained PBMNCs).

### Statistical analysis

For each variable under study, mean values and their standard deviation (SD), median, range, and both the 10th to 90th and the 25th to 75th percentiles were calculated, using a computer program (SPSS 12, SPSS, Inc., Chicago, IL). The significance of the differences observed among the different subpopulations of BM pre-pDCs was calculated using the paired Wilcoxon's or Friedman nonparametric tests. *p* Values of less than 0.05 were considered to be associated with significance.

## RESULTS

### Distribution of pre-pDCs in normal BM

Pre-pDCs represented  $0.28 \pm 0.13\%$  of all nucleated cells and were identified in normal BM samples based on the sequential gating strategy shown in Fig. 1: HLA-DR<sup>+</sup> cells were first gated, in a second step both CD34<sup>+</sup> and CD123<sup>high</sup> cells were selected, and finally only those cells showing high levels of CD123 were gated as pre-pDCs (Figs. 1A–1C). Within this subset of cells, three different maturation-associated subpopulations of pre-pDCs were clearly identified in all BM samples analyzed, based on their differential expression of CD34, HLA-DR, CD123, and CD45 (Figs. 1D–1G). Those pre-pDCs displaying more immature phenotypic features ("subpopulation I") showed a characteristic CD34<sup>++</sup>/HLA-DR<sup>++</sup>/+++ /CD123<sup>++</sup>/CD45<sup>++</sup> immunophenotype, representing  $15 \pm 6\%$  of all BM pDCs,  $-0.03 \pm 0.01\%$  of all nucleated BM cells, and  $3.4 \pm 0.7\%$  of all CD34<sup>+</sup> HPCs. In turn,

intermediate pre-pDCs ("subpopulation II") showed a CD34+/HLA-DR+/++/CD123+/+++/CD45+/++ phenotypic profile, corresponding to  $23 \pm 6\%$  of all BM pDCs ( $0.08 \pm 0.03\%$  of all nucleated cells). Finally, the more mature BM pre-pDCs ("subpopulation III") were CD34-/HLA-DR+/++/CD123+/+++/CD45++, comprising the majority of all pre-pDCs ( $56 \pm 11\%$  of all pre-pDCs and  $0.17 \pm 0.09\%$  of all nucleated BM cells; Figs. 1F and 1G). CD34+ HPCs—not considered to belong to the pDC lineage—represented  $0.92 \pm 0.18\%$  of the whole BM cellularity (Fig. 1H). Mature myeloid DCs were also systematically detected in normal BM, at a frequency of  $0.09 \pm 0.04\%$  of all nucleated BM cells.

### Immunophenotypic characteristics of the different maturation-associated subpopulations of BM pre-pDCs

Overall, the three subsets of pre-pDCs identified showed immunophenotypic differences among them (Figs. 2 and 3). HLA Class I (HLA-ABC) and Class II (HLA-DR, HLA-DP, and HLA-DQ) antigen-presenting molecules showed a similar pattern of expression along the maturation of pre-pDCs: both were expressed at high levels among the more immature BM pre-pDCs, and then their expression transiently decreased at the intermediate stage of maturation ( $p < 0.03$ ), to slightly recover in the more mature BM pre-pDCs ( $p < 0.05$ , for all HLA molecules except for HLA-DP; Figs. 2A-2D and 3A-3D). Of note, although the pattern of expression of HLA-DQ was similar to that of other HLA-II molecules, its levels of expression were clearly lower. Interestingly, Stage I pre-pDCs expressed significantly higher levels of all HLA molecules, compared to the remaining CD34+ HPCs (Figs. 2A-2D and 3A-3D).

The intensity of expression of CD303 (BDCA-2) and CD304 (BDCA-4) DC-associated molecules, as well as of CD85j, progressively increased among the three pre-pDCs along the maturation in BM; accordingly, dim but detectable levels of CD304 and CD85j were already found for the more immature pre-pDCs, while CD303 expression only became positive in the following stage (Stage II), expression of all three molecules significantly increasing thereafter (Figs. 2E-2G, 3E-3G, and 1I). Interestingly, CD304 could be detected in an earlier stage than CD303. Expression of other DC-associated molecules, such as CD1a, CD1b, CD1c, CD209, CD275, L-SECtin, and both the TLR4 and the TLR9 toll-like receptors, was constantly absent in all subpopulations of BM pre-pDCs. Of note, Stage I pre-pDCs showed significantly higher levels of both CD304 and CD85j, allowing the unequivocal distinction between CD34+ pre-pDCs and other CD34+ progenitors (Figs. 1J, Figs. 2E-2G, and 3E-3G).

CD123 (IL-3 $\alpha$  chain receptor) showed a strong intensity of expression already in Subpopulation I, significantly higher than that observed in CD34+ HPCs (Figs. 2R and

3R), its reactivity significantly increasing in the more mature subpopulations of BM pre-pDCs. In addition to CD123, BM pre-pDCs also expressed other cytokine receptors (Figs. 2P-2U and 3P-3U). Accordingly, CD116 (GM-CSF-R), CD117 (c-kit, SCF-R), and CD126 (IL6-R) were present in the more immature pre-pDCs (Subpopulation I), but their levels decreased thereafter to become completely negative in the more mature pre-pDCs (Subpopulation III); in turn, a relatively high and stable expression of CD184 (CXCR4) and CD197 (CCR7) was observed throughout the different stages of maturation of pre-pDCs. By contrast, expression of other cytokine and chemokine receptors, such as CD127 (IL7-R), CD181 (CXCR1), CD182 (CXCR2), and CD195 (CCR5), was constantly negative on BM pre-pDCs.

Regarding the expression of adhesion and costimulatory molecules (Figs. 2N-2O and 3N-3O), it should be noted that CD86 was strongly positive in Subpopulation I; its expression significantly ( $p = 0.03$ ) decreased thereafter, becoming negative on Stage II and III pre-pDCs, while absent on non-pre-pDCs CD34+ progenitor cells (Figs. 2N and 3N). In turn, expression of CD4 (Figs. 2L and 3L) was initially absent, its expression becoming detectable at progressively higher amounts, in Subpopulations II and III ( $p = 0.03$  for Subpopulation I vs. Subpopulation II and Subpopulation II vs. Subpopulation III). In a similar way, expression of CD2 and CD40 increased in the more advanced stages of maturation of BM pre-pDCs; however, for these markers, different subsets of CD2+ ( $22 \pm 4\%$ ) versus CD2- ( $78 \pm 4\%$ ) and CD40+ ( $48 \pm 6\%$ ) versus CD40- ( $52 \pm 6\%$ ) BM pre-pDCs were identified within Subpopulation III (Figs. 2K and 3K and Figs. 2M and 3M, respectively). In contrast, the CD80 costimulatory molecule was systematically absent in normal BM pre-pDCs. Expression of CD54 showed a slight increase from Stage II to Stage III pre-pDCs (Figs. 2I and 3I;  $p = 0.02$ ), while reactivity for CD11a decreased from Subpopulation I to Subpopulations II and III (Figs. 2H and 3H). The expression of the CD62L adhesion molecule remained positive and relatively stable ( $p > 0.05$ ) among the different maturation-associated subpopulations of BM pre-pDCs (Figs. 2J and 3J); CD56 was constantly negative. Interestingly, the more immature pre-pDCs were positive for CD11c (Figs. 2O and 3O), while in the following maturation stages, two different subsets were identified: at Stage II 30% of cells intensified their positivity ( $p = 0.04$  for Stage II vs. Stage I CD11c+ cells), whereas the remaining 70% became CD11c- ( $p = 0.04$  for Stage II vs. Stage I CD11c- cells); at Stage III, the proportion of positive cells decreased to 14%<sup>31</sup> but their fluorescence intensity increased further ( $p = 0.04$ ). Interestingly, expression of CD303 and CD304 was lower among Stage II and III CD11c+ cells than on their CD11c- counterpart (Table 2).

Regarding other antigens, both CD45 and its CD45RA isoform (Figs. 2AC, 2AD, 3AC, and 3AD) showed a similar



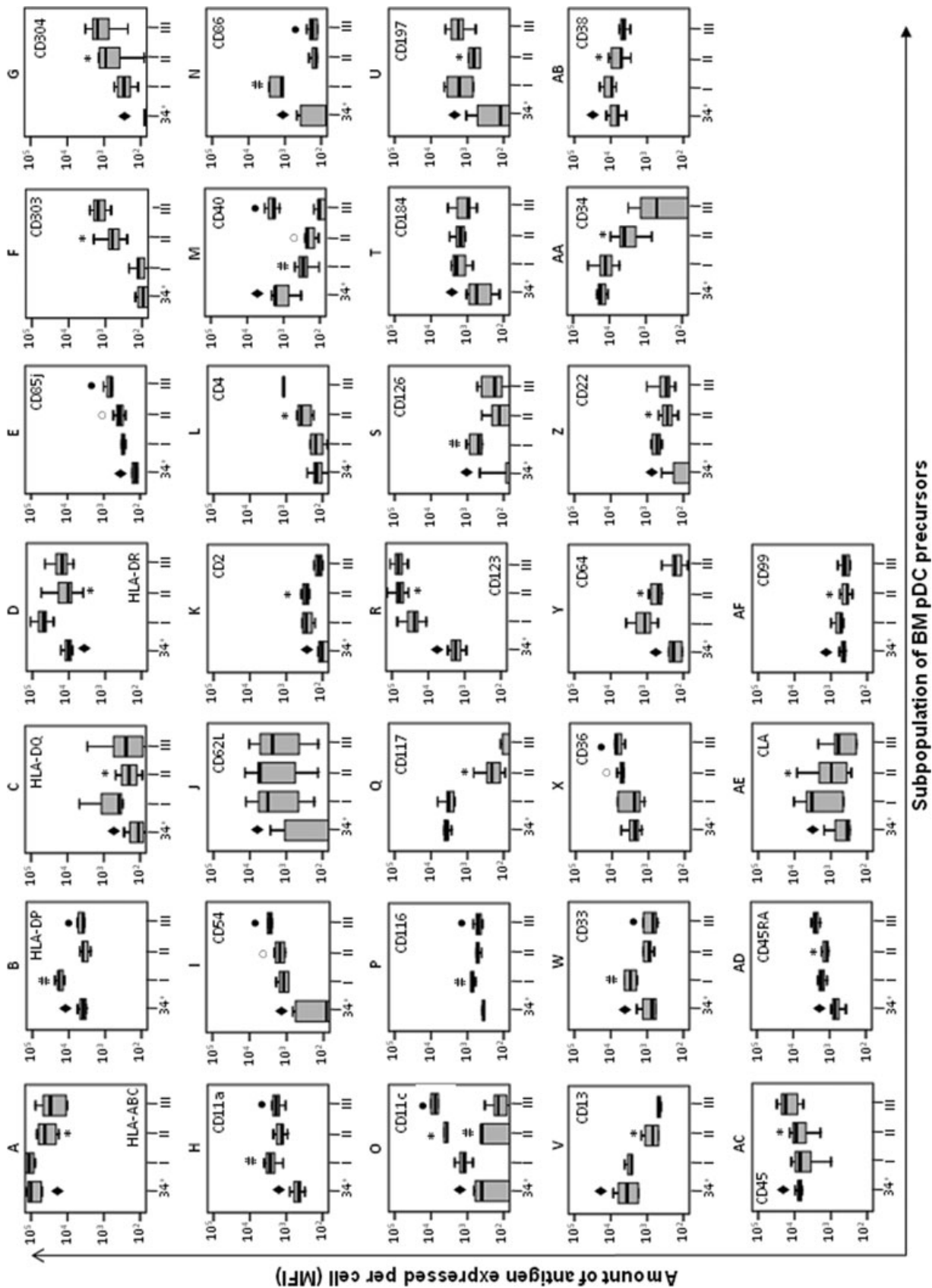


Fig. 2. Expression of antigen-presenting molecules, DC-related markers, cytokine and chemokine receptors, adhesion proteins, costimulatory molecules, and other cell surface molecules, in the different maturation-associated subpopulations of pre-pDCs and CD34<sup>+</sup> HPCs present in normal adult BM. Results are expressed as MFI (relative arbitrary mean units scaled from 0 to 262,144). Notched boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and vertical lines correspond to the median value and both the 10th and 90th percentiles, respectively. \**p* < 0.05 for Stage I versus Stage II, #Stage I versus Stage III, ○Stage I versus Stage II, □Stage II versus Stage III, and ●Stage I versus Stage III, and ◆Stage I versus CD34<sup>+</sup> HPCs.

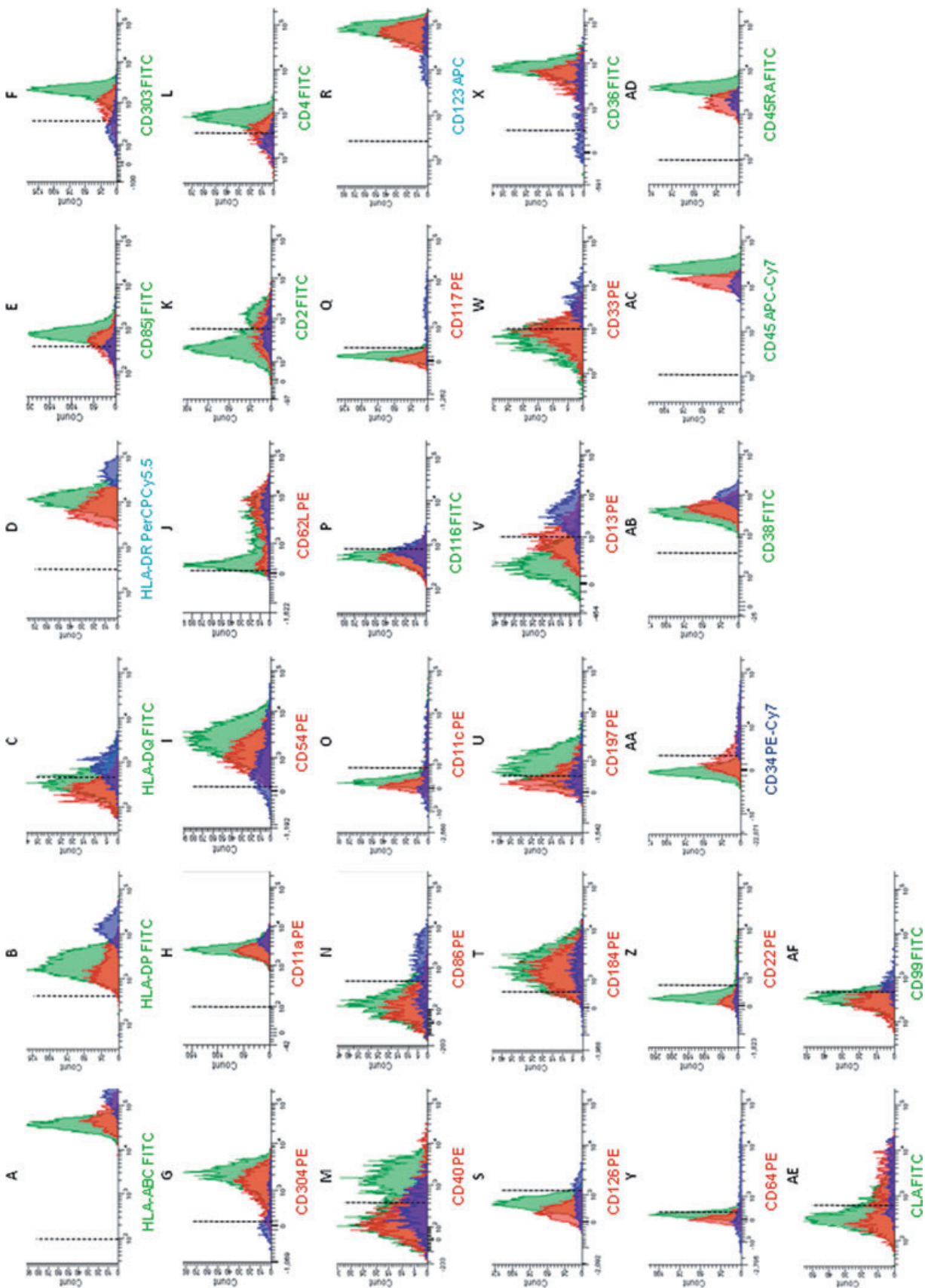


Fig. 3. Histogram representation of the phenotype of the three populations of pDCs identified in normal BM. Stage I pre-pDCs are colored in blue, Stage II pre-pDCs in red, and Stage III pre-pDCs in green. Dotted lines correspond to the cutoff value for positivity in each histogram.

**TABLE 2. CD303 and CD304 expression among CD11c– and CD11c+ Stage II and III pre-pDCs\***

	Stage II pre-pDCs		Stage III pre-pDCs	
	CD11c–	CD11c+	CD11c–	CD11c+
CD303	58 ± 108	Negative	350 ± 279	23 ± 185
CD304	83 ± 59	Negative	427 ± 253	Negative

\* Results are expressed as mean ± 1 SD of MFI. Differences were not significant ( $p \leq 0.14$ ).

pattern of expression; accordingly, both markers were clearly positive in Subpopulation I and their expression significantly ( $p \leq 0.001$ ) increased in the more mature subpopulations of BM pre-pDCs. By contrast, pre-pDCs were constantly negative for CD45RO. Expression of CD34, as well as of both CD13 and CD33 (Figs. 2V, 2WW, 2AA, 3V, 3WW, and 3AA), progressively decreased during pDC differentiation ( $p \leq 0.006$ ), becoming either negative or dimly positive in pre-pDCs included in Subpopulation III. A similar pattern of expression was also observed for CD38 and CD99 (Figs. 2AB, 2AF, 3AB, and 3AF). In turn, CD22 and CD36 (Figs. 2X, 2Z, 3X, and 3Z), present in the more immature BM pre-pDCs (Subpopulation I), showed a transient decrease (CD22) or a progressive increase (CD36) along the maturation of BM pre-pDCs. Both the cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) and CD64 antigens showed a heterogeneous expression within the three different maturation-associated subsets of pre-pDCs, the mean intensity of expression of both antigens decreasing from Subpopulation I to Subpopulation III. Of note, these two latter molecules were expressed at significantly higher levels in Stage I pre-pDCs versus other CD34+ HPCs (Figs. 2AE and 2Y). All other myeloid-, mast cell-, and eosinophil-associated enzymes tested were constantly negative in all subpopulations of BM pre-pDCs analyzed; similarly, all BM pre-pDCs were negative for the 7.1, CD90, yCD79a, and CD79b antigens.

### Morphologic characteristics of the different subsets of BM pre-pDCs

Freshly purified BM pre-pDCs from Subpopulation I displayed morphologic characteristics typical of relatively immature cells (Fig. 4A). Accordingly, they corresponded to large cells, usually with an eccentric, nonround, and slightly cleaved single nucleus, with nondispersed chromatin, and no nucleoli. These cells lacked cytoplasmic granules and showed intense basophilia at the cytoplasmic level. In turn, freshly purified BM pre-pDCs from Subpopulation II (Fig. 4B) had both a lower size and a cytoplasmic basophilia in association with a slightly nuclei indentation compared to pre-pDCs from Subpopulation I. The more mature pre-pDCs present in normal BM differed from the previously described subpopulations in

that they displayed more convolute and irregular nuclear shapes (Fig. 4C). As expected, none of the three subpopulations of freshly purified BM pre-pDCs showed cytoplasmic elongations.

Once cultured for 24 hours in the presence of IL-3, no major morphologic changes were found with respect to the corresponding freshly purified subsets of BM pDCs (Figs. 4D-4F). However, addition of CpG ODN to cultured BM pre-pDCs clearly modified their morphologic characteristics, and the more mature pre-pDC subpopulations showed a more clearly evident irregular shape and a more condensed chromatin (Figs. 4D-4I).

### Functional characteristics of the different subsets of BM pre-pDCs

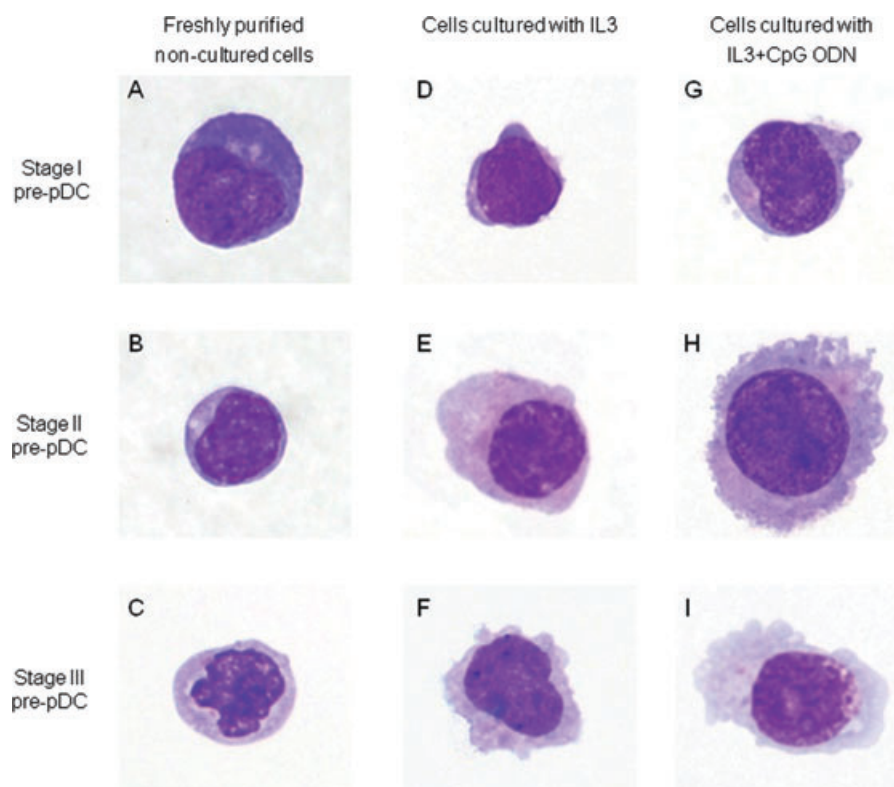
Overall, BM pre-pDCs showed an intermediate endocytic activity between that of BM T lymphocytes (negative control) and monocytes (positive control); surprisingly, BM Stage I pre-pDCs showed the highest endocytic ability<sup>32</sup> ( $p < 0.05$  vs. non-pre-pDC CD34+ HPCs), although differences observed between the three maturation-associated compartments of BM pre-pDCs did not reach significance (Fig. 5). In contrast, secretion of detectable amounts of soluble IFN- $\alpha$  could only be identified for the more mature BM pre-pDCs (Subpopulation III) in the three samples analyzed. A minimum of 30,000 cells were required in culture to obtain detectable concentrations of this cytokine. The levels of IFN- $\alpha$  secreted by BM mature pre-pDCs were lower than those obtained for PB pDCs stimulated under the same conditions (Fig. 6).

Regarding the ability of BM pre-pDCs to induce T-cell proliferation, Stage I pre-pDCs did not induce proliferation of either CD4+ or CD8+ allogeneic T cells. By contrast, the other two more mature BM pre-pDCs did induce T-cell proliferation, this being lower when T cells were stimulated with Stage II than with Stage III BM pre-pDCs (median percentages of proliferating cells of 3 and 6% and of 4 and 4.5% for the CD4+ and CD8+ T-cell subsets, when allogeneic T lymphocytes were cocultured with purified BM Stage II and Stage III pre-pDCs, respectively; Fig. 7). As expected, PHA-stimulated cells (positive control) showed a high proliferation rate (median of 69 and 71% of proliferating cells among the CD4+ and CD8+ T-cell compartments, respectively), while BM MNCs induced PB T cells to proliferate at slightly lower levels than those observed for purified pre-pDC subsets (median of 2.5 and 4% for the CD4+ and CD8+ T-cell subsets, respectively).

## DISCUSSION

In this study we identify and characterize for the first time different maturation-associated subsets of normal human BM pre-pDCs. Overall, three subpopulations of pre-pDCs with an increasingly higher degree of maturity—Stage I, II,





**Fig. 4. Representative microphotographs of the morphologic characteristics of the different maturation-associated subpopulations of human BM pre-pDCs before and after cell culture.** Individual cells displayed were stained with May-Grünwald-Giemsa and visualized at a  $\times 1000$  magnification using conventional light microscopy. Freshly purified pre-pDCs representative of Subpopulations I, II, and III are shown in A, B, and C, respectively. (D–F) Representative Stage I, Stage II, and Stage III pre-pDCs after culture for 24 hours in the presence of IL-3; (G–I) representative examples of Stage I, II, and III pre-pDCs after culture in the presence of both IL-3 and CpG ODN, respectively. As shown in these latter three panels, an irregular shape resembling cytoplasmic dendritic processes became evident in the more mature subpopulations of pre-pDCs after stimulation with CpG ODN.

and III pre-pDCs—were systematically identified, which showed decreasing expression of CD34 associated with a stronger reactivity for CD45, in association with a CD123<sup>hi</sup>, HLA-DR<sup>hi</sup> phenotype. The fact that a relatively high proportion of Stage I cells already expressed pDC-related proteins (e.g., CD304<sup>+/+</sup>) in the absence of other lineage-associated markers (e.g., MPO<sup>–</sup> and lysozyme<sup>–</sup>), together with the demonstration of other clear phenotypic differences between Stage I pre-pDCs and other non-pre-pDCs CD34<sup>+</sup> HPC supports their pDC origin; despite this, the absence of pDC-specific markers in a fraction of the former cell population may raise the possibility that some of the cells included among the population of Stage I pre-pDCs could correspond to contaminating non-pre-pDC CD34<sup>+</sup> HPCs. The observation that expression of CD304 would precede that of CD303 suggests that this marker could be of greater utility for the identification of pDC commitment among normal and neoplastic CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursor cells.

As expected, the more immature BM pre-pDCs showed expression of molecules associated with HPCs,

such as CD34 and the CD116, CD117, and CD126 cytokine receptors; all these markers became progressively negative during the following maturational stages. Unexpectedly, Stage I pre-pDCs were found to share phenotypic characteristics with other well-defined DC populations, since markers typically expressed by other PB DC subtypes but not by circulating pDCs (e.g., CD11c, CD13, CD33, CD64, and CLA) were expressed in Stage I pre-pDCs together with pDC-associated proteins (e.g., CD123 and CD304). Interestingly, between Stage I and Stage II pre-pDCs, markers typically expressed by myeloid DCs as well as by Langerhans and dermal DCs<sup>33</sup> dramatically decreased their positivity, while specific pDC antigens appeared (e.g., CD303) or clearly increased their intensity of expression (e.g., CD123, CD304). Of note, morphologic characteristics of these CD34<sup>+</sup> pre-pDCs were also consistent with a minimally differentiated cell, and even their morphology did not get altered either by the addition of pDC-specific maturational stimuli IL-3 or by the pDC-specific activation stimuli CpG ODN. Similarly, these cells were both unable to secrete IFN- $\alpha$  under short-term

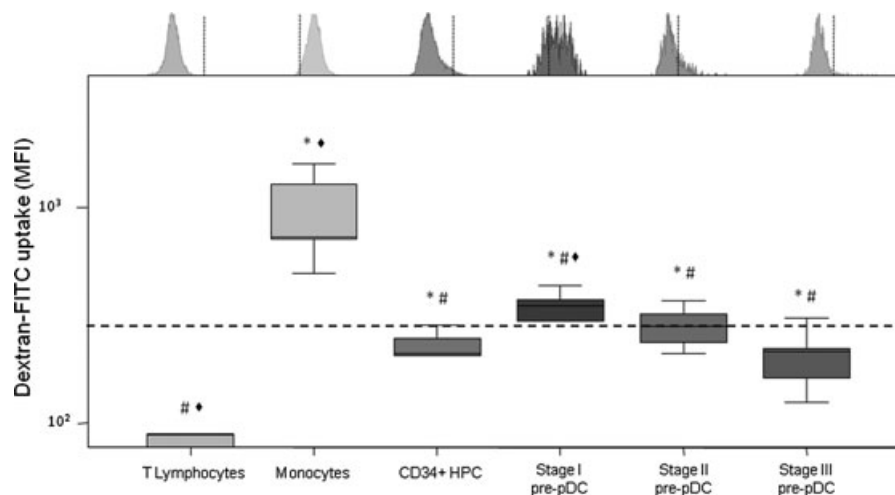


Fig. 5. Dextran-FITC uptake by different subsets of BM pre-pDCs in comparison to normal BM T lymphocytes (negative control), monocytes (positive control), and CD34+ HPCs coexisting in the same sample. Stage I and II subsets of BM pre-pDCs showed uptake of dextran-FITC at intermediate levels between those of normal BM T lymphocytes and monocytes; although no significant differences were found among the three maturation stages, a slightly decreasing ability to uptake dextran-FITC was observed along the maturation of pre-pDCs. Stage I was the only population to have a significantly higher endocytosis capacity than CD34+ HPCs. Results are expressed as MFI values (arbitrary relative linear units scaled from 0 to 262,144). Notched boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and vertical lines correspond to the median value and both the 10th and 90th percentiles, respectively. Significantly different ( $p < 0.05$ ) from \*lymphocytes, #monocytes, and ♦CD34+ HPCs. Histogram graphs from a representative BM sample are also depicted at the top (dotted lines correspond to the cutoff value for positivity—dextran-FITC uptake—in each histogram).

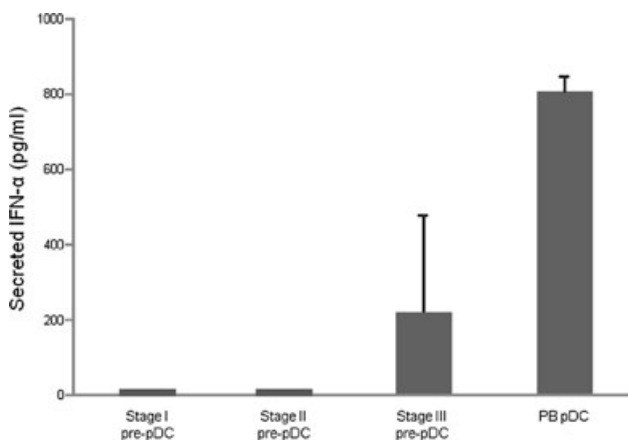
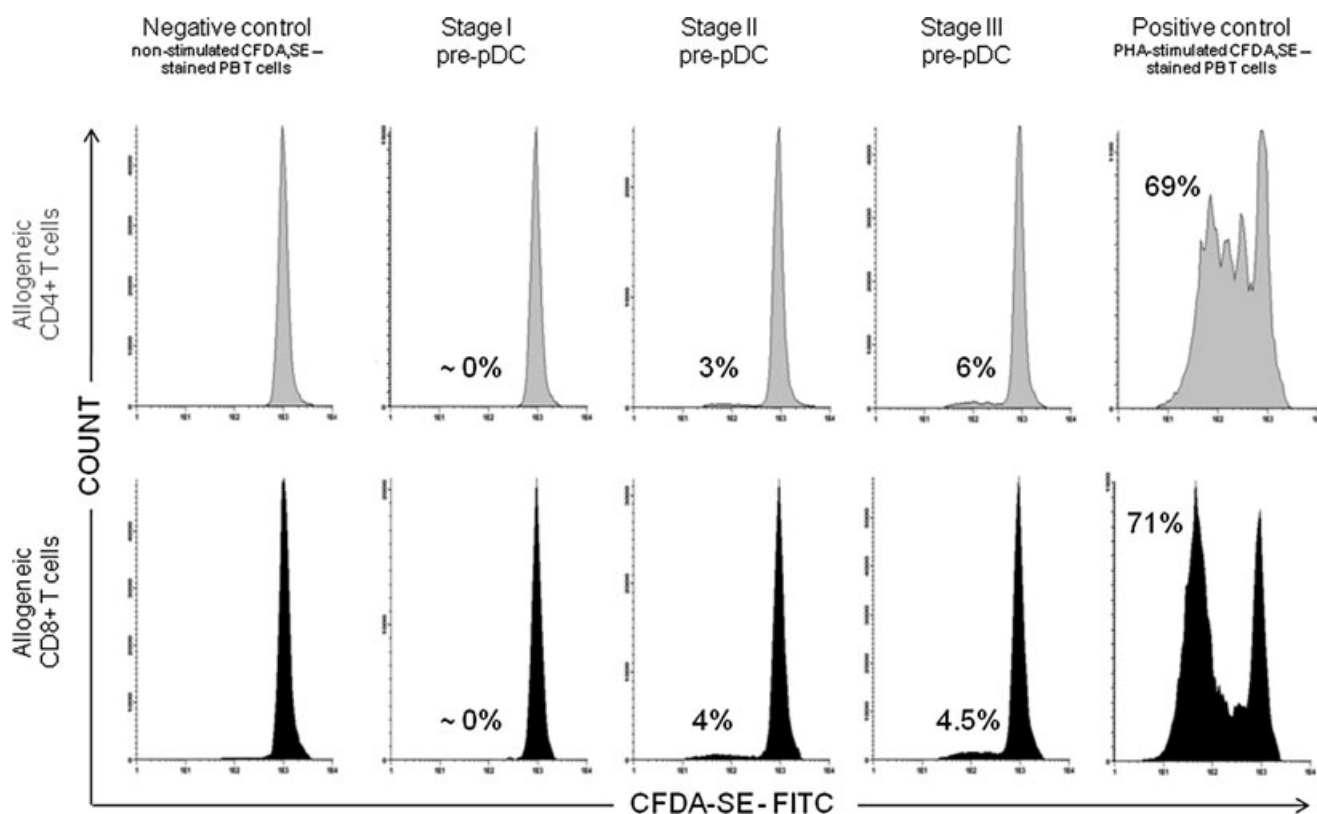


Fig. 6. IFN- $\alpha$  secretion by different subsets of BM pre-pDCs and PB pDCs incubated for 24 hours with both IL-3 and CpG ODN. Secretion of IFN- $\alpha$  was detectable in the culture supernatants of the more mature pre-pDCs, once a relatively high number of cells ( $>30,000$ ) were seeded, however, markedly lower than the ones secreted by PB DCs under the same conditions. In contrast, Stage I and Stage II pre-pDCs were unable to produce IFN- $\alpha$ . The bar heights represent mean values and vertical lines correspond to 1 SD of the mean (data from three different samples).

culture conditions and unable to induce T-cell proliferation when cocultured with allogenic PB T cells.

In addition to HPC-related molecules, Stage I pre-pDCs also expressed myeloid-associated markers, such as CD11c, CD13, CD33, and CD64, all these markers progressively becoming negative in the intermediate and more advanced pre-pDC maturation stages. Myeloid markers have been also found by others to be expressed by pDC leukemic cells,<sup>34</sup> although this finding has been usually misunderstood. The observation that the more immature BM pre-pDCs from healthy adults coexpress CD13 and CD33 together with low amounts of CD11c and CD64 would point out that the expression of myeloid-associated markers on their leukemic counterpart might not be attributed to a phenotypic aberration, but it could more likely reflect a less differentiated pDC leukemia phenotype. In addition to the expression of myeloid-related antigens, we could also detect positivity for the CD22 lymphoid-associated marker already on Stage I pre-pDCs in the absence of cyCD79a. The fact that DCs could share a common myeloid-lymphoid progenitor has been suggested in humans,<sup>35</sup> in mice,<sup>36</sup> and in their human malignant counterpart;<sup>37</sup> however, to the best of our knowledge this is the first time a very early pDC precursor sharing lymphoid and myeloid markers has been described in detail. Further studies are required to elucidate whether or not this pre-pDC subset would correspond to the latest





**Fig. 7.** Ability to induce T-cell proliferation by each of the purified BM pre-pDC subsets. Nonstimulated and PHA-stimulated (CFDA-SE) stained PBMCs were used as negative and positive controls (illustrated for the CD4+ T-cell subset in the upper panels), respectively. Stage I pre-pDCs did not induce proliferation of either CD4+ or CD8+ allogeneic T cells whereas the other two more mature BM pre-pDCs induced T cells to proliferate, with lower proliferation rates for T cells stimulated with Stage II versus Stage III BM pre-pDCs (illustrated for the CD8+ T-cell subset in the lower panels). Numbers indicate the median percentage of proliferating cells.

maturation stage of a common myeloid-lymphoid DC progenitor.

Unexpectedly, markers typically expressed by relatively mature DCs, such as CLA and CD86, were already present at relatively high levels on Stage I pre-pDCs. CLA is a cell surface glycoprotein that specifically binds to E-selectin, which has been suggested to play a role in lymphocyte homing to the skin. Interestingly, neoplastic pDCs have been shown to express CLA in a relatively high percentage of pDC tumors, and this finding has been related with the particular skin tropism of these malignancies.<sup>38</sup> However, in this study we show that the expression of this molecule progressively decreases in more mature BM pre-pDCs (Stages II and III), suggesting that the less differentiated BM pre-pDCs could have the highest ability to migrate to the skin. In turn, coexpression of CD86 on Stage I pre-pDCs, in the absence of other costimulatory and signaling molecules (e.g., CD40 and CD2), would support the notion that these cells could play a role in inducing tolerance, both in the BM and in the skin, in line with recent observations.<sup>31,39-41</sup> Although the exact mechanisms involved in inducing immune tolerance are cur-

rently unknown, it has been suggested that pDCs and/or pre-pDCs could promote either the differentiation of CD4+/CD25- T cells into CD4+/CD25+ regulatory cells<sup>42-44</sup> or the inhibition of responsiveness of antigen specific T cells, due to the absence of inflammatory costimuli or their lack on CD40 expression,<sup>45</sup> and both conditions were observed in normal BM Stage I pre-pDCs; the fact that the percentage of CD4+/CD25+ regulatory T cells did not change among the different stimulation conditions used in the T-lymphocyte proliferation assays performed in this study (data not shown) would also support the latter hypothesis. Regardless of the type of immunologic effect generated (response vs. tolerance) against specific antigens, pDCs should have the ability to take up and present antigens. In line with this, here we show that BM Stage I pre-pDCs are able to endocytose exogenous particles (e.g., dextran-FITC) and that such endocytic activity is notably higher than that of the more mature subsets of BM pre-pDCs (Stages II and III pDCs). Even more, the ability of Stage I pre-pDCs to capture dextran was similar to that of PB myeloid DCs (data not shown). In addition to their ability to capture and endocytose antigens, Stage I pre-pDCs

showed the highest expression of MHC molecules, essential for presenting antigens to T cells, independently of the nature of the subsequent immunologic response induced. The fact that such endocytic activity of Stage I pre-pDCs is associated with a lack of IFN- $\alpha$  production by these cells, as well as their inability to induce proliferation of allogenic T cells, further supports their role as “tolerogenic” versus “immunogenic” DCs. Clinically, the tolerogenic ability of BM pre-pDCs—which phenotypically correspond to the here referred Stage III pre-DCs—has been already observed among allogenic BM-transplanted patients.<sup>31,41</sup> As Stage I pre-pDCs seem to be better suited than Stage III pre-DCs for antigen uptake and presentation, in the absence of allogeneic T-cell stimulation, it could be suggested that Stage I pre-pDCs could be even more powerful in suppressing the proliferative response of naïve or memory T cells to alloantigens; in such a case they might be considered as a potentially useful tool in balancing graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect after an allogeneic implant. However, additional functional experiments are required to confirm this hypothesis.

The phenotypic changes observed along the maturation of pre-pDCs from Stage I to Stage II and III precursors are consistent with a progressive commitment of these cells into the pDC lineage: loss of HPC-associated antigens and most myeloid-related molecules, as observed in the differentiation of the white blood cell populations present in BM,<sup>46</sup> in association with a progressively increased expression of DC- and antigen-presenting cell-related markers such as CD303, CD304, and among Stage III pre-pDCs, also CD40. Of note, CD4 started being dimly expressed at Stage II pre-pDCs, and its expression became clear on Stage III pre-pDCs. This latter marker, together with CD56, have been considered as essential molecules for the diagnosis of pDC leukemia/lymphoma<sup>20,24</sup> also identified recently as “agranular CD4+/CD56+ hematodermic neoplasm.”<sup>27</sup> Despite this, CD56 is generally absent on nonneoplastic pre-pDCs,<sup>47</sup> as also found in this study, where none of the three subsets of BM pre-pDCs showed reactivity for this antigen. In contrast to these observations, a subset of CD123+/CD4+/CD56+ pDCs has been recently described in PB from individuals treated with Flt-3 ligand<sup>48</sup> and a new subset of DCs sharing pDC and NK properties has been described in mice.<sup>49</sup> Despite this, in the absence of further studies confirming the presence of a defined population of human pDCs expressing CD56 “*ex vivo*,” this should be considered as an aberrant marker and therefore it may be used to differentiate leukemic pDCs from normal residual pDCs and pre-pDCs. Regarding CD4, its absence on Stage I pre-pDCs also suggests the potential existence of CD4- pDC leukemias; in fact, in our experience based on a prospective series of more than 50 pDC leukemias, in around 12% of the cases, leukemic pDCs lacked CD4.<sup>50</sup>

In line with the above-described maturational-related phenotypic changes, Stage II and III pre-pDCs progressively acquired morphologic and functional features of more differentiated cells, particularly when they were cultured under optimal *in vitro* stimulatory conditions. Actually, Stage III pre-pDCs showed similar phenotypical,<sup>28</sup> morphologic, and functional features to those of PB pDCs<sup>7,47</sup>—although a lower ability to secrete IFN- $\alpha$  was found in the present study—suggesting that these cells would represent the terminal stage of pDC identifiable in BM and would be ready to leave the BM and exert their sentinel function through the peripheral circulation. Despite the fact that TLR9 has been reported to mediate responses to unmethylated CpG dinucleotides and to induce secretion of IFN- $\alpha$ , its expression could not be detected on any of the three subsets of BM pre-pDCs, including the more mature (Stage III) subset. However, in addition to clear morphologic changes, secretion of IFN- $\alpha$  by Stage III pre-pDCs was detected on this cell subset after CpG stimulation, suggesting that the procedures used for cell fixation and permeabilization before staining could be suboptimal for the detection of cyTLR9 by flow cytometry. This is further supported by the fact that cyTLR9 expression, tested on PB pDCs and B cells, was also negative (data not shown) and that, to the best of our knowledge, only human pDCs matured in the presence of IL-3 have been reported so far to stain for TLR9 by immunofluorescence microscopy.<sup>51</sup>

In summary, in this study we demonstrate the presence of three different maturation stages of pre-pDCs in normal human adult BM, which show unique phenotypical, morphologic, and functional characteristics. Interestingly, the more immature pre-pDCs here described show coexpression of myeloid- and lymphoid-associated markers in association with tolerogenic and/or highly protective phenotypic properties, further studies being required to establish the precise role of these Stage I pre-pDCs in the immune response. In addition, our studies provide a frame of reference for the phenotypic identification and characterization of the neoplastic counterpart of normal pre-pDCs.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work has been partially supported by the following grants: RETICC RD06/0020/0035 from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain, and the Fundación LAIR (Contract Grant 1313), Madrid, Spain; LMM is supported by a grant from the Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain (by Order 14.11.2003). The authors thank José Juan Pérez Morán for his collaboration in the study.


#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Soumelis V, Liu YJ. From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. *Eur J Immunol* 2006; 36:2286-92.
2. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271-96.
3. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001;106: 255-8.
4. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
5. Steinman RM, Hawiger D, Liu K, Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Iyoda T, Ravetch J, Dhodapkar M, Inaba K, Nussenzweig M. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann NY Acad Sci* 2003;987:15-25.
6. Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 2001;106:259-62.
7. MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002;100:4512-20.
8. Masten BJ, Olson GK, Tarleton CA, Rund C, Schuyler M, Mehran R, Archibeque T, Lipscomb MF. Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. *J Immunol* 2006;177:7784-93.
9. Lafontaine M, Landry D, Montplaisir S. The human thymic dendritic cell phenotype and its modification in culture. *Cell Immunol* 1992;142:238-51.
10. Furio L, Berthier-Vergnes O, Ducarre B, Schmitt D, Peguet-Navarro J. UVA radiation impairs phenotypic and functional maturation of human dermal dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2005;125:1032-8.
11. Hart DN, McKenzie JL. Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells. *J Exp Med* 1988;168:157-70.
12. McIlroy D, Troadec C, Grassi F, Samri A, Barrou B, Autran B, Debre P, Feuillard J, Hosmalin A. Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors. *Blood* 2001;97:3470-7.
13. Takahashi K, Asagoe K, Zaishun J, Yanai H, Yoshino T, Hayashi K, Akagi T. Heterogeneity of dendritic cells in human superficial lymph node: in vitro maturation of immature dendritic cells into mature or activated interdigitating reticulum cells. *Am J Pathol* 1998;153:745-55.
14. Egner W, McKenzie JL, Smith SM, Beard ME, Hart DN. Identification of potent mixed leukocyte reaction-stimulatory cells in human bone marrow. Putative differentiation stage of human blood dendritic cells. *J Immunol* 1993;150:3043-53.
15. Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carbalido J, Picker LJ, Lund-Johansen F. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:12551-6.
16. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, de Saint-Vis B, Dezutter-Dambuyant C, Jacquet C, Schmitt D, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *Adv Exp Med Biol* 1997;417:21-5.
17. Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, Vicari A, O'Garra A, Biron C, Briere F, Trinchieri G. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2001;2:1144-50.
18. Bjorck P. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* 2001;98:3520-6.
19. Wu L, Dakic A. Development of dendritic cell system. *Cell Mol Immunol* 2004;1:112-8.
20. Chaperot L, Bendriss N, Manches O, Gressin R, Maynadie M, Trimoreau F, Orfeuvre H, Corront B, Feuillard J, Sotto JJ, Bensa JC, Briere F, Plumas J, Jacob MC. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2001;97:3210-7.
21. Briere F, Bendriss-Vermare N, Delale T, Burg S, Corbet C, Rissoan MC, Chaperot L, Plumas J, Jacob MC, Trinchieri G, Bates EE. Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 2002;63:1081-93.
22. Dijkman R, van Doorn R, Szuhai K, Willemze R, Vermeer MH, Tensen CP. Gene-expression profiling and array-based CGH classify CD4+CD56+ hematodermic neoplasm and cutaneous myelomonocytic leukemia as distinct disease entities. *Blood* 2007;109:1720-7.
23. Jacob MC, Chaperot L, Mossuz P, Feuillard J, Valensi F, Leroux D, Bene MC, Bensa JC, Briere F, Plumas J. CD4+CD56+ lineage negative malignancies: a new entity developed from malignant early plasmacytoid dendritic cells. *Haematologica* 2003;88:941-55.
24. Feuillard J, Jacob MC, Valensi F, Maynadie M, Gressin R, Chaperot L, Arnoulet C, Brignole-Baudouin F, Drenou B, Duchayne E, Falkenrodt A, Garand R, Homolle E, Husson B, Kuhlein E, Le Calvez G, Sainty D, Sotto MF, Trimoreau F, Bene MC. Clinical and biologic features of CD4(+)CD56(+) malignancies. *Blood* 2002;99:1556-63.
25. Reimer P, Rudiger T, Kraemer D, Kunzmann V, Weissinger F, Zetl A, Konrad Muller-Hermelink H, Wilhelm M. What is CD4+CD56+ malignancy and how should it be treated? *Bone Marrow Transplant* 2003;32:637-46.
26. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 1999;10:1419-32.
27. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow

- SH, Ralfkiaer E, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Duncan LM, Grange F, Harris NL, Kempf W, Kerl H, Kurrer M, Knobler R, Pimpinelli N, Sander C, Santucci M, Sterry W, Vermeer MH, Wechsler J, Whittaker S, Meijer CJ. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005;105:3768-85.
28. Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Sanchez ML, Canizo MC, Fernandez ME, Vaquero JM, Laso FJ, Escribano L, San Miguel JF, Orfao A. Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHC II+/lineage- cells. *Clin Exp Immunol* 1999;118:392-401.
29. Tholen DW, Kroll M, Astles JR, Caffo AL, Happe TM, Krouwer J, Lasky F. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline. NCCLS-EP6-A. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2003.
30. Quah BJ, Warren HS, Parish CR. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc* 2007;2:2049-56.
31. Waller EK, Rosenthal H, Jones TW, Peel J, Lonial S, Langston A, Redei I, Jurickova I, Boyer MW. Larger numbers of CD4(bright) dendritic cells in donor bone marrow are associated with increased relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2001;97:2948-56.
32. Servida F, Soligo D, Lambertenghi Delilieri G. Functional differences between dendritic cells derived from CD34+ bone marrow and peripheral blood stem cells. *Haematologica* 2000;85:352-5.
33. Strunk D, Egger C, Leitner G, Hanau D, Stingl G. A skin homing molecule defines the Langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *J Exp Med* 1997;185:1131-6.
34. Garnache-Ottou F, Chaperot L, Biichle S, Ferrand C, Remy-Martin JP, Deconinck E, de Tailly PD, Bulabois B, Poulet J, Kuhlein E, Jacob MC, Salaun V, Arock M, Drenou B, Schilling F, Seilles E, Tiberghien P, Bensa JC, Plumas J, Saas P. Expression of the myeloid-associated marker CD33 is not an exclusive factor for leukemic plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2005;105:1256-64.
35. Ishikawa F, Niino H, Iino T, Yoshida S, Saito N, Onohara S, Miyamoto T, Minagawa H, Fujii S, Shultz LD, Harada M, Akashi K. The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. *Blood* 2007;110:3591-660.
36. Naik SH, Sathe P, Park HY, Metcalf D, Proietto AI, Dakic A, Carotta S, O'Keeffe M, Bahlo M, Papenfuss A, Kwak JY, Wu L, Shortman K. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 2007;8:1217-26.
37. Garnache-Ottou F, Feuillard J, Saas P. Plasmacytoid dendritic cell leukaemia/lymphoma: towards a well defined entity? *Br J Haematol* 2007;136:539-48.
38. Petrella T, Meijer CJ, Dalac S, Willemze R, Maynadie M, Machet L, Casasnovas O, Vergier B, Teitell MA. TCL1 and CLA expression in agranular CD4/CD56 hematodermic neoplasms (blastic NK-cell lymphomas) and leukemia cutis. *Am J Clin Pathol* 2004;122:307-13.
39. Fugier-Vivier IJ, Rezzoug F, Huang Y, Graul-Layman AJ, Schanie CL, Xu H, Chilton PM, Ildstad ST. Plasmacytoid precursor dendritic cells facilitate allogeneic hematopoietic stem cell engraftment. *J Exp Med* 2005;201:373-83.
40. Abe M, Wang Z, de Creus A, Thomson AW. Plasmacytoid dendritic cell precursors induce allogeneic T-cell hyporesponsiveness and prolong heart graft survival. *Am J Transpl* 2005;5:1808-19.
41. Lonial S, Torre C, David E, Harris W, Arellano M, Waller EK. Regulation of alloimmune responses by dendritic cell subsets. *Exp Hematol* 2008;36:1309-17.
42. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ, Blazar BR, Chen W. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004;173:4433-42.
43. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, Liu YJ. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 2005;436:1181-5.
44. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000;192:303-10.
45. Martin E, O'Sullivan B, Low P, Thomas R. Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity* 2003;18:155-67.
46. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;60:1-13.
47. Bueno C, Almeida J, Lucio P, Marco J, Garcia R, de Pablos JM, Parreira A, Ramos F, Ruiz-Cabello F, Suarez-Vilela D, San Miguel JF, Orfao A. Incidence and characteristics of CD4(+)/HLA DRhi dendritic cell malignancies. *Haematologica* 2004;89:58-69.
48. Petrella T, Comeau MR, Maynadie M, Couillault G, De Muret A, Maliszewski CR, Dalac S, Durlach A, Galibert L. "Agranular CD4+ CD56+ hematodermic neoplasm" (blastic NK-cell lymphoma) originates from a population of CD56+ precursor cells related to plasmacytoid monocytes. *Am J Surg Pathol* 2002;26:852-62.
49. Chan CW, Crafton E, Fan HN, Flook J, Yoshimura K, Skarica M, Brockstedt D, Dubensky TW, Stins MF, Lanier LL, Pardoll DM, Housseau F. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 2006;12:207-13.

50. Bueno C, Almeida J, Orfao A. Clinical and biological characterization of leukemic cells representing the leukemic counterpart of dendritic cells. *Haematologica* 2002;Suppl. 1:239. Abstract Book.
51. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004;5:190-8. 



## **Artículo 2:** "Clasificación y comportamiento clínico de la neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica de acuerdo con su perfil inmunofenotípico de maduración"

**Objetivo.** La neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica (NCDPB) constituye una entidad muy poco frecuente de leucemias/linfomas de difícil diagnóstico debido tanto a su heterogeneidad clínica y biológica, como por presentar características que se solapan con las de otras hemopatías malignas. En este trabajo analizamos la posible relación existente entre el estadio madurativo de la célula tumoral de la NCDPB y las características clínico-biológicas de la enfermedad, así como su evolución y pronóstico.

**Pacientes, materiales y métodos.** En total, en este estudio analizamos 46 pacientes con NCDPB que subclasificamos mediante CMF multiparamétrica en tres grupos en función del estadio madurativo de las CDp tumorales. De acuerdo al patrón de expresión de CD34 y CD117 los pacientes se clasificaron en: 1) NCDPB inmadura, cuando existía expresión de CD34 en al menos parte de los blastos; 2) NCDPB intermedia, en la que la célula tumoral mostraba positividad (al menos parcial) para CD117, en ausencia de expresión de CD34 y; 3) NCDPB madura, definida por la ausencia de expresión de ambos marcadores (CD34<sup>neg</sup> CD117<sup>neg</sup>) en las células tumorales.

**Resultados.** En las NCDPB inmaduras (n= 8/46), los blastos mostraban un fenotipo atípico, caracterizado por ausencia de expresión de CD56 y la existencia de una población de células tumorales de línea de CDp, acompañada sistemáticamente de otra población inmadura de blastos CD34<sup>+</sup> distinta de la de línea de CDp; además, estos pacientes generalmente no presentaban afectación extramedular (p. ej. infiltración cutánea) al diagnóstico. Por el contrario, los pacientes cuyas CDp tumorales expresaban un perfil fenotípico más maduro, mostraron mayor afectación extramedular, particularmente de la piel, y mayor frecuencia de infiltración de órganos linfoides secundarios. Así, en las NCDPB con fenotipo intermedio y maduro observamos afectación cutánea en 67% y 86% de los pacientes, respectivamente, vs. 14% de las NCDPB inmaduras (p≤.02).

Asimismo, en ningún caso clasificado como fenotípicamente inmaduro se detectó la presencia de adenopatías y esplenomegalia, mientras que en las NCDPB intermedias/maduras se observó una frecuencia de infiltración de órganos linfoides secundarios superior al 50% de los casos ( $p < .05$ ). También observamos diferencias entre los subgrupos madurativos de NCDPB en lo que se refiere a parámetros de laboratorio, asociándose la presencia de neutropenia con las formas más inmaduras/intermedias (86%/55% vs. 17% en los casos inmaduros/intermedios vs. maduros;  $p \leq .04$ ) y la leucocitosis con las formas maduras (0%/26% vs. 62% en los casos inmaduros/intermedios vs. maduros;  $p \leq .04$ ); estos últimos pacientes mostraban también con mayor frecuencia incremento de los niveles de LDH sérica (77% vs. 17%/52% en los casos maduros vs. inmaduros/intermedios;  $p \geq .02$ ). En términos generales, la supervivencia global de las NCDPB era generalmente corta, independiente del estadio madurativo de las CDp tumorales. No obstante, cabe señalar que los únicos tratamientos que resultaron eficaces, al menos en parte, y por tanto se asociaron con supervivencias globales más prolongadas, fueron los tratamientos habitualmente empleados para pacientes con LLA, que incluyen profilaxis/tratamiento del SNC y/o el TAPH.

**Conclusiones.** Nuestros resultados muestran que el perfil madurativo de la CDp tumoral de pacientes con NCDPB es muy heterogéneo, pudiendo contribuir a explicar, al menos en parte, el comportamiento clínico tan variable (desde formas de tipo “leucemia aguda” a formas más “linfomatosas”) de la NCDPB. A pesar del pésimo pronóstico de la mayoría de los pacientes, la administración de protocolos terapéuticos asociados a LLA con profilaxis del SNC y/o el TAPH, de todos los protocolos terapéuticos evaluados en este trabajo, parecen ser los únicos regímenes efectivos. De acuerdo con estos resultados, sería necesario redefinir los criterios diagnósticos de esta entidad y mejorar las estrategias terapéuticas empleadas (p. ej. adoptando regímenes más agresivos que incluyan profilaxis del SNC) con el fin de alcanzar remisiones completas más duraderas.



# Classification and clinical behavior of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms according to their maturation-associated immunophenotypic profile

Lourdes Martín-Martín<sup>1</sup>, Antonio López<sup>1</sup>, Belén Vidriales<sup>2</sup>, María Dolores Caballero<sup>2</sup>, António Silva Rodrigues<sup>3</sup>, Silvia Inês Ferreira<sup>4</sup>, Margarida Lima<sup>5</sup>, Sérgio Almeida<sup>6</sup>, Berta Valverde<sup>7</sup>, Pilar Martínez<sup>8</sup>, Ana Ferrer<sup>9</sup>, Jorge Candeias<sup>10</sup>, Francisco Ruíz-Cabello<sup>11</sup>, Josefa Marco Buadesa<sup>12</sup>, Amparo Sempere<sup>13</sup>, Neus Villamor<sup>14</sup>, Alberto Orfao<sup>1,\*</sup>, Julia Almeida<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Cancer Research Centre (IBMCC, USAL-CSIC), Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL) and Department of Medicine and Cytometry Service, University of Salamanca (USAL), Salamanca, Spain

<sup>2</sup>Hematology Department and IBSAL, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>3</sup>Hematology Department, Hospital de Santo António dos Capuchos, Lisboa, Portugal

<sup>4</sup>Santa Luzia Medical Laboratory, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>5</sup>Clinical Hematology Department, Hospital de Santo António, Porto, Portugal

<sup>6</sup>Hematology Department, Hospital Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>7</sup>Hematology Department, Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, San José, Costa Rica

<sup>8</sup>Hematology Department, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>9</sup>Pathology Department, Hospital del Mar, Barcelona. IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain

<sup>10</sup>Immunology Department, Hospital São João, Porto, Portugal

<sup>11</sup>Clinical Analysis and Immunology Department, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

<sup>12</sup>Hematology Department, Hospital General de Castellón, Castellón, Spain

<sup>13</sup>Hematology Department, University Hospital La Fé, Valencia, Spain

<sup>14</sup>Hospital Clinic, Barcelona, Spain

\*These authors have contributed equally to this work

## Correspondence to:

Alberto Orfao, e-mail: orfao@usal.es

**Keywords:** blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm, flow cytometry, maturation profile, acute leukemia, lymphoma

**Received:** April 15, 2015

**Accepted:** May 11, 2015

**Published:** May 25, 2015

## ABSTRACT

**Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDCN) is a rare subtype of leukemia/lymphoma, whose diagnosis can be difficult to achieve due to its clinical and biological heterogeneity, as well as its overlapping features with other hematologic malignancies. In this study we investigated whether the association between the maturational stage of tumor cells and the clinico-biological and prognostic features of the disease, based on the analysis of 46 BPDCN cases classified into three maturation-associated subgroups on immunophenotypic grounds. Our results show that blasts from cases with an immature plasmacytoid dendritic cell (pDC) phenotype exhibit an uncommon CD56<sup>-</sup> phenotype, coexisting with CD34<sup>+</sup> non-pDC tumor cells, typically in the absence of extramedullary (e.g. skin) disease at presentation. Conversely, patients with a more mature blast cell phenotype more frequently displayed skin/extramedullary involvement and spread into secondary lymphoid tissues. Despite the dismal outcome, acute lymphoblastic leukemia-type therapy (with central nervous system prophylaxis) and/or allogeneic stem cell transplantation appeared to be the only effective therapies. Overall, our findings indicate that the maturational profile**

**of pDC blasts in BPDCN is highly heterogeneous and translates into a wide clinical spectrum -from acute leukemia to mature lymphoma-like behavior-, which may also lead to variable diagnosis and treatment.**

## INTRODUCTION

Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDCN) is a relatively rare subtype of leukemia/lymphoma - < 1% of hematologic malignancies [1]- which has been recently categorized in the 2008 World Health Organization (WHO) classification of hematological diseases [2] under acute myeloid leukemia (AML) and related precursor neoplasms. Accumulating evidences show that the normal cellular counterpart of BPDCN resides in the plasmacytoid dendritic cell (pDC) lineage [3]. Despite all the above, diagnosis of BPDCN still remains a challenge; this is probably due to several reasons including its overlapping features with other entities, the lack of recurrent and specific chromosomal abnormalities [4, 5], and its heterogeneous clinical presentation with multiple and variable tissue localizations [6–8]. In addition, diagnosis of BPDCN can be difficult to achieve, particularly when blast cells do not completely fit the typical CD4<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> CD123<sup>+</sup> lineage (Lin)<sup>–</sup> immunophenotypic profile [6, 9]. In fact, at present it is now well-established that tumor cells from BPDCN do express markers which have been classically related to other cell lineages such as CD33, TdT, CD79a, CD2 and CD7 [10, 11], and evidences exist about a broad range of atypical phenotypic profiles in a substantial proportion of cases (up to more than one third of cases), including absence of CD56 [12] and CD4 [13]. Such heterogeneity is also observed at the genetic and molecular level, since multiple and diverse, but unspecific, chromosomal and molecular alterations have been identified [4, 5] with even mutually exclusive gene mutations [14]. Therefore, BPDCN are not only clinically heterogeneous but they also show a considerable biologic diversity which in some cases makes diagnosis difficult. This, together with the low prevalence of the disease, has hampered the study of large series of patients, with few exceptions [6, 7, 15], most reports on BPDCN being based on single or just a few cases. Besides, some of the few larger series reported so far are biased, as they generally include only cases showing cutaneous involvement in the absence of systemic disease and/or they have used rather (even retrospective) restrictive phenotypic inclusion criteria; this has probably contributed to the lack of awareness about disease heterogeneity. In such case we might wonder whether or not, the clinical, phenotypical and genetic diversity of BPDCN (e.g. the maturational stage of blast cells and/or their genetic profile) could contribute to further subclassify this entity, similarly to what happens with other neoplasms, such as B and T-cell malignancies or even AML [16].

Here we describe a relatively large series of 46 BPDCN classified into three subgroups, based on the expression of maturation-associated immunophenotypic markers on tumor vs. normal pDC and pDC precursors. Our major goal was to investigate whether the stage of maturational arrest of pDC tumor cells would be associated with distinct and unique clinico-biological and prognostic features of the disease.

## RESULTS

### Clinical and laboratory features at presentation

From all 46 cases analyzed, four (9%) were children (median age of 11 years; range: 8 to 12 years) and 42 were adults (median age of 71 years; range: 25 to 91 years), with a clear male predominance: 35 males (76%) vs. 11 females (24%) (Table 1). Most cases (27/45, 60%) consulted because of organ involvement (e.g. skin lesions) in association with B symptoms (32/45 cases, 71%) (Table 1). In a smaller proportion of cases, diagnosis was made because of bleeding (6/45, 13%), bone pain (4/45, 9%) or just the presence of cytopenias with or without blast cells in a routine blood analysis (5/44, 11%). In line with this, most cases presented with extramedullary involvement (33/45, 73%) mainly consisting of skin lesions (29/45 cases, 64%) and/or, to a lesser extent, testis (6%) and central nervous system (CNS) involvement (9% of cases). Presence of lymphadenopathies, splenomegaly and hepatomegaly was detected on physical examination in 51%, 38% and 22% of cases, respectively. Five patients (16%) had an associated myelodysplastic syndrome (MDS) and 3 (7%) had other non-hematological neoplasms (prostate  $n = 2$ - and colon cancer).

Blood cell counts revealed leukocytosis ( $> 10 \times 10^9$  WBC/l) in 33% of the cases, anemia ( $< 100$ g hemoglobin/l) in 63%, thrombocytopenia ( $< 100 \times 10^9$ /l) in 64% of the cases and neutropenia ( $< 1.5 \times 10^9$ /l) in around half (48%) of cases (Table 2). LDH serum levels were increased in 55% of the patients. The majority of cases (61% and 93%) showed presence of blast cells in both PB (median blast cell percentage of 39%; range: 2% to 83%) and BM (median of 78%; range: 4% to 100%), respectively.

### Immunophenotypic subgroups of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms

Patients with BPDCN were divided into three groups according to the maturational stage of the blast/tumor cells as defined by the pattern of expression of CD34 and CD117: 1) immature blastic pDC neoplasms

**Table 1: Clinical characteristics of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms patients classified according to their maturation-associated immunophenotypic profile**

Blast cell phenotype					
	Total cases	Group 1 (immature)	Group 2 (intermediate)	Group 3 (mature)	<i>P</i> -value
Demographics	<i>n</i> = 46	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 24	<i>n</i> = 14	
Age (years)*	61 ± 22 (8–91)	68 ± 22 (25–91)	56 ± 23 (8–85)	68 ± 19 (11–83)	.05 <sup>c</sup>
Children/Adults	4/42 (9%/91%)	0/8 (0%/100%)	3/21 (13%/87%)	1/13 (7%/93%)	NS
Sex (male/female)	35/11 (76%/24%)	6/2 (75%/25%)	15/9 (63%/37%)	14/0 (100%/0%)	.008 <sup>c</sup>
Reason for consulting					
Routine blood analysis	5/44 (11%)	0/6 (0%)	3/24 (13%)	2/14 (14%)	NS
B & other general symptoms	32/45 (71%)	6/7 (86%)	17/24 (71%)	9/14 (64%)	NS
Bleeding	6/45 (13%)	1/7 (14%)	3/24 (13%)	2/14 (14%)	NS
Bone pain	4/45 (9%)	0/7 (0%)	4/24 (17%)	0/14 (0%)	NS
Organ involvement	27/45 (60%)	0/7 (0%)	14/24 (58%)	13/14 (93%)	≤ .03 <sup>a, b, c</sup>
Physical examination					
Adenopathies	23/45 (51%)	0/7 (0%)	14/24 (58%)	9/14 (64%)	.007 <sup>a, b</sup>
Splenomegaly	17/45 (38%)	0/7 (0%)	13/24 (54%)	4/14 (29%)	.01 <sup>a</sup>
Hepatomegaly	10/45 (22%)	0/7 (0%)	7/24 (29%)	3/14 (21%)	NS
Extramedullary involvement	33/45 (73%)	1/7 (14%)	19/24 (79%)	13/14 (93%)	≤ .004 <sup>a, b</sup>
- Skin <sup>1</sup>	29/45 (64%)	1/7 (14%)	16/24 (67%)	12/14 (86%)	≤ .02 <sup>a, b</sup>
- CNS	4/45 (9%)	0/7 (0%)	3/24 (13%)	1/14 (7%)	NS
- Testis <sup>2</sup>	2/34 (6%)	0/5 (0%)	1/15 (7%)	1/14 (7%)	NS
Clinical history					
Associated neoplasia	3/44 (7%)	0/6 (0%)	1/24 (4%)	2/14 (14%)	NS
Myelodysplastic syndrome	5/32 (16%)	2/6 (33%)	1/19 (5%)	2/7 (29%)	NS

Results expressed as number of cases from all cases with available data and (percentage) or as \*mean ± one standard deviation (range). Statistically significant differences were found between <sup>a</sup>group 1 group 2, <sup>b</sup>group 1 group 3 and <sup>c</sup>group 2 group 3. <sup>1</sup>None showed mucosal involvement, <sup>2</sup>only in male patients, both children. NS: no statistically significant differences (*p* > 0.05), CNS: central nervous system.

(8/46 cases; 17%) showed expression of CD34 in at least a fraction of the blast cells; 2) intermediate blastic pDC neoplasms (24/46 patients; 52%) typically displayed partial positivity for CD117 in the absence of CD34 expression on the blast cells, and; 3) mature cases (14/46 cases; 30%) had a CD34<sup>+</sup> CD117<sup>+</sup> tumor pDC immunophenotype. Of note, among all immature cases (Group 1) neoplastic pDC systematically coexisted with another blast cell population of myeloid or mixed myeloid plus B-lymphoid origin, accounting for a median of 50% of the whole blast cell population (range: 30% to 90%); such coexisting non-pDC lineage blast cells systematically showed

strong CD34 and CD117 expression, whereas the pDC component was typically partially positive for CD34 and negative or dim positive for CD117 (Figure 1J, 1K, and 1L). In contrast, both intermediate (Group 2) and mature (Group 3) blastic pDC neoplasms showed no blast/tumor cell population other than the pDC, all these cases being systematically negative for CD34 by definition. Expression of CD117 (in the absence of CD34) was restricted per definition to Group 2, with a median percentage of CD117<sup>+</sup> cells of 18% (range: 5% to 100%).

Other immunophenotypic markers which showed different patterns of expression on pDC blast

**Table 2: Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms classified according to their maturation-associated immunophenotypic profile: laboratory parameters**

Laboratory parameters	Total cases <i>n</i> = 46	Blast cell phenotype			<i>P</i> -value
		Group 1 (immature) <i>n</i> = 8	Group 2 (intermediate) <i>n</i> = 24	Group 3 (mature) <i>n</i> = 14	
Anemia (< 100 g/l)	28/44 (64%)	6/7 (86%)	16/24 (67%)	6/13 (46%)	NS
Leukopenia (< 4 × 10 <sup>9</sup> /l)	13/43 (30%)	4/7 (57%)	8/23 (35%)	1/13 (8%)	.03 <sup>a</sup>
Neutropenia (< 1.5 × 10 <sup>9</sup> /l)	20/41 (49%)	6/7 (86%)	12/22 (55%)	2/12 (17%)	≤ .04 <sup>a, b</sup>
Thrombocytopenia (< 100 × 10 <sup>9</sup> /l)	28/43 (65%)	3/7 (43%)	16/24 (65%)	9/12 (75%)	NS
Leukocytosis (> 10 × 10 <sup>9</sup> /l)	14/43 (33%)	0/7 (0%)	6/23 (26%)	8/13 (62%)	≤ .04 <sup>a, b</sup>
Elevated LDH (≥ 450 U/l)	22/40 (55%)	1/6 (17%)	11/21 (52%)	10/13 (77%)	.02 <sup>a</sup>
<b>Presence of blast cells (by morphology)</b>					
Peripheral blood % cases	27/44 (61%)	4/7 (57%)	14/24 (58%)	9/13 (69%)	NS
% blast cells <sup>1*</sup>	39% (2%–83%)	11% (2%–35%)	45% (2%–80%)	39% (10%–83%)	NS
Bone marrow % cases	41/44 (93%)	8/8 (100%)	21/24 (88%)	12/12 (100%)	NS
% blast cells <sup>1*</sup>	78% (4%–100%)	68% (46%–73%)	80% (18%–99%)	85% (4%–100%)	NS

Results expressed as number of cases from all cases with available data (percentage) or as \*median (range). Statistically significant differences were found between <sup>a</sup>group 1 group 3 and <sup>b</sup>group 2 group 3. <sup>1</sup>Only in cases with blast cells. NS: no statistically significant differences (*p* > 0.05) found, LDH: lactate dehydrogenase; β<sub>2</sub>-microg: β<sub>2</sub>-microglobulin. No statistical differences were observed among the groups regarding creatinine and C-reactive protein levels.

cells included (Supplementary Table 2 and Figure 2): CD7 and CD33 which showed a greater expression among cases in the intermediate immunophenotypic Group 2 (*p* = .008 and *p* = .04, respectively) and to a lesser extent also, in case of CD7, in Group 3 (*p* > .05); CD56, which was dimly expressed only in a fraction of cases in Group 1, but widely and intensely positive on tumor cells from Group 2 and Group 3 cases (*p* ≤ .04), and; NG2, a marker that was absent in Group 1 cases (*p* ≤ .03) but clearly expressed in most of the other more mature Group 2 and Group 3 patients (Figure 1, panel II, plots M to X and Figure 2).

### Clinical and laboratory features of the distinct maturation-associated subgroups of BPDCN

Overall, no significant differences were observed among the three phenotypic groups of BPDCN, as regards the distribution of patients according to age. Although a clear male predominance was found in all groups, this was significantly more pronounced in Group 3, where all 14 cases were males (*p* < .008) (Table 1). Patients in the three groups showed a similar reason for consulting except for cases in Group 1 which less frequently referred because of organ involvement. In line with this, Group 1 cases also showed a significantly lower frequency (vs. the other two groups) of extramedullary involvement (14% vs.

79% and 93%, *p* ≤ .004), lymphadenopathies (0% vs. 58% and 64%, *p* ≤ .007) and splenomegaly (0% vs. 54% and 29%, *p* = .01). Group 2 cases showed intermediate profiles between those of Group 1 and Group 3 patients, as regards the frequency of extramedullary involvement, particularly of skin lesions.

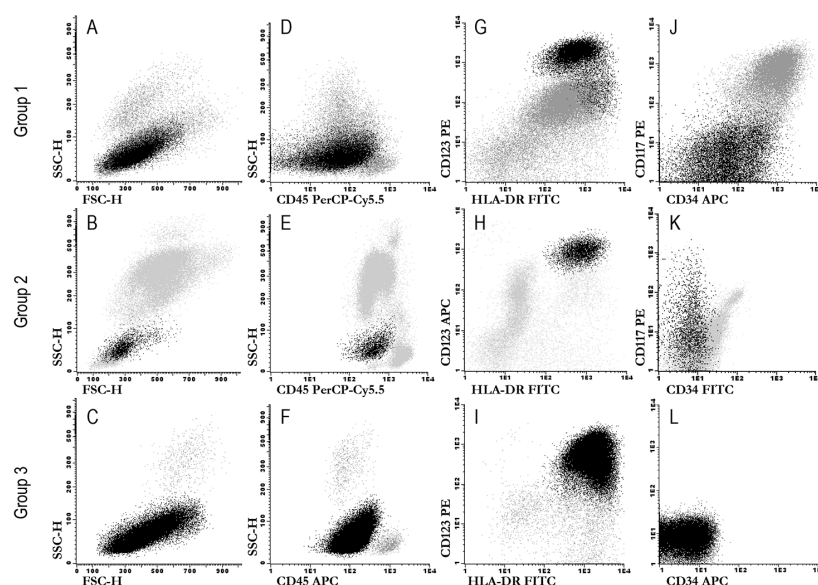
Despite similar levels of BM and PB infiltration by tumor pDCs were found among the three groups, the frequency of anemia, leukopenia and neutropenia progressively decreased from Group 1 to Group 2 and Group 3 cases (Table 2). In contrast, the frequency of thrombocytopenia was slightly higher among the latter two groups. The frequency of cases with increased LDH levels was significantly higher in Group 3 vs. Group 1 cases.

### Patient treatment and outcome

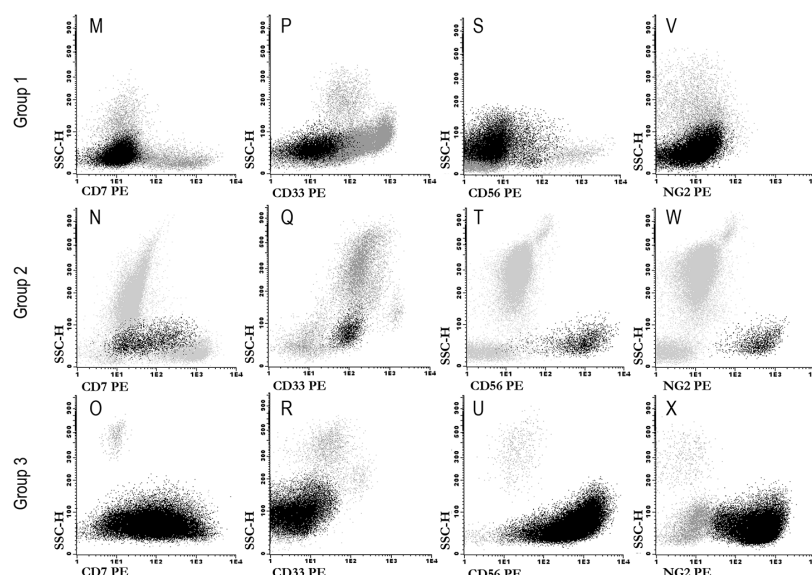
All 4 Group 1 patients who were treated with curative intention, systematically received an AML-type regimen; this is in contrast with Group 3 cases, who more frequently received either lymphoma (6/9 cases) or acute lymphoblastic leukemia (ALL; 3/9 patients) directed therapies (*p* = .01) (Table 3). In turn, Group 2 patients received AML (8/19), ALL (5/19) and lymphoma (6/19) associated therapy. Despite the diverse therapies administered, complete remission (CR) was achieved in the great majority of cases (92%) who completed



Panel I



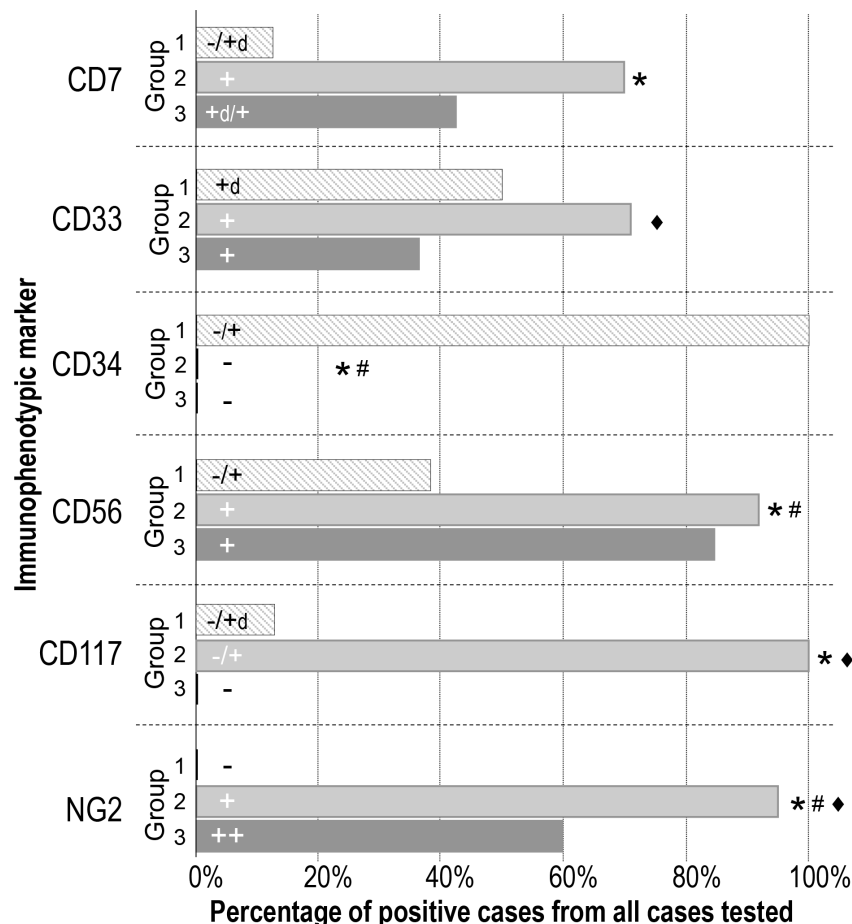
Panel II



**Figure 1: Illustrating dot plots of the three immunophenotypically defined groups of BPDCN.** The neoplastic plasmacytoid dendritic cell population is depicted as black dots, whereas other leukocytes are depicted in gray. **Panel I:** plots A to I illustrate a combination of markers which are useful for the identification of blastic pDC, while plots J to L show the pattern of expression of CD34 and CD117 for representative cases from the different maturation-associated groups of BPDC neoplasms here defined. **Panel II:** plots M to X display the pattern of expression observed for those markers found to be expressed at statistically different levels among the three maturation-associated groups of BPDC neoplasms.

the treatment protocol ( $n = 25$ ), regardless of their phenotypic group ( $p > .05$ ); nevertheless, the outcome was poor with a median overall survival (OS) of only 11 months due to early relapse. Interestingly, relapse and/or progression at the CNS level was observed in a high proportion of cases (33%), mostly among Group 2 and Group 3 (29% and 50%, respectively) patients (Table 3); this was even more frequent when only patients who

achieved CR were evaluated (60%), particularly in those cases where a lymphoma-type therapy was administered (Supplementary Table 3). Overall, no significant differences were observed in the outcome of the patients from the three distinct immunophenotypic groups (Table 3 and Figure 3A and 3B). In contrast, adulthood (age at diagnosis  $> 15$  years;  $p = .04$ ) (Figure 3C), presence of lymphadenopathies ( $p = .03$ ) and hepatomegaly ( $p = .03$ )



**Figure 2: Immunophenotypic differences observed for individual markers on neoplastic pDC from PBDCN patients classified into the three different maturation-associated groups defined in this study.** Only those markers that showed statistically significant differences -CD7, CD33, CD34, CD56, CD117 and NG2- among the three maturation-associated groups of BPDCN neoplasms are shown; the percentage of positive cases and the pattern of expression (intensity) observed for the above listed markers are represented as bars for each group of patients. The correspondence between MFI values and the different categories of intensity of expression defined for the individual markers is shown in Supplementary Table 2. Statistically significant differences were found between \*Group 1 vs. Group 2, #Group 1 vs. Group 3 and ♦Group 2 vs. Group 3.

(Figure 3D and 3E), skin lesions ( $p = .04$ ) (Figure 3F), increased serum LDH ( $\geq 450\text{U/L}$ ;  $p = .001$ ) (Figure 3H) and  $\beta_2$ -microglobulin ( $\geq 3\text{ mg/L}$ ;  $p = .02$ ) were all associated with a poorer outcome (Table 4). In turn, leukopenia ( $p = .05$ ) (Figure 3G), administration of ALL-type therapy (Figure 3I) and allogeneic stem cell transplantation (Figure 3J) ( $p = .03$  and  $p = .04$ , respectively) were associated with a better outcome. Multivariate analysis of prognostic factors (Table 4) showed that serum LDH levels were the only independent prognostic factor for OS in aggressively-treated patients ( $p = .005$ , HR = 6.6; 95% CI = 1.8–24.8).

## DISCUSSION

BPDCN is a rare but very aggressive disease whose nomenclature, ontogeny and underlying biology have evolved over the years, since its first description by Brody

et al. in 1995 [17]. Despite the number of cases reported in recent years has increased, as well as our knowledge about the biology of its postulated normal cellular counterpart (i.e. pDC lineage cells) [9, 18–20], the diagnosis of the disease still remains a challenge. This is due in part, to the clinical and phenotypical diversity observed among the patients and the overlapping features with other hematologic malignancies. In order to elucidate whether the clinical heterogeneity of BPDCN is related to the maturation stage of pDC tumor cells, here we analyzed a relatively large series of 46 patients, whose general clinical features were fully compatible with those previously reported for this rare entity [6, 7], except for the proportion of cases presenting with skin involvement that was lower (64% vs. 76%–100%) in our vs. other series [6, 7, 15, 21]. Although there is no definitive explanation for such difference, it might be due to the fact that until recently, skin lesions have been considered one of the major features

**Table 3: Type of therapy and clinical outcome of patients with BPDCN classified according to the immunophenotypic-associated maturation profile of blast cells**

Type of therapy administered	Total cases <i>n</i> = 46	Blast cell phenotype			<i>P</i> - value
		Group 1 (immature) <i>n</i> = 8	Group 2 (intermediate) <i>n</i> = 24	Group 3 (mature) <i>n</i> = 14	
AML-type	12/45 (27%)	4/8 (50%)	8/23 (35%)	0/14 (0%)	≤ .01 <sup>a, b</sup>
High risk ALL-type	8/45 (18%)	0/8 (0%)	5/23 (22%)	3/14 (21%)	NS
C(H)OP and C(H)OP-like type	12/45 (27%)	0/8 (0%)	6/23 (26%)	6/14 (43%)	.04 <sup>a</sup>
AHSC transplantation	5/45 (11%)	1/8 (13%)	4/23 (17%)	0/14 (0%)	NS
Palliative	10/45 (22%)	3/8 (38%)	3/23 (13%)	4/14 (29%)	NS
No treatment	3/45 (7%)	1/8 (13%)	1/23 (4%)	1/14 (7%)	NS
<b>Clinical outcome</b>					
Median OS (months)	7 (4–10)	2 (0–4)	10 (5–15)	4 (0–10)	NS
Complete remission <sup>1</sup>	23/25 (92%)	2/2 (100%)	14/15 (93%)	7/8 (88%)	NS
Relapse	17/23 (74%)	1/2 (50%)	10/14 (71%)	6/7 (86%)	NS
CNS relapse/progression	10/30 (33%)	0/3 (0%)	5/17 (29%)	5/10 (50%)	NS
Median OS of aggressively treated non-transplanted cases (months)	11 (5–17)	23 <sup>2</sup>	11 (7–15)	10 (0–23)	NS
Overall mortality	42/46 (91%)	7/8 (88%)	22/24 (92%)	13/14 (93%)	NS
Early deaths	12/46 (26%)	4/8 (50%)	4/24 (17%)	4/14 (29%)	NS
Deaths after remission	18/23 (78%)	1/2 (50%)	11/14 (79%)	6/7 (86%)	NS

Results expressed as number of cases from all cases with available data (percentage). Statistically significant differences were found between <sup>a</sup>group 1 group 3 and <sup>b</sup>group 2 versus group 3. <sup>1</sup>Only in aggressively treated patients, <sup>2</sup>only one case. BPDC: blastic plasmacytoid dendritic cell; AML: acute myeloblastic leukemia; ALL: acute lymphoblastic leukemia; NS: no statistically significant differences ( $p > 0.05$ ); AHSC: allogeneic hematopoietic stem cell; OS: overall survival; CNS: central nervous system.

that point to the diagnosis of BPDCN and consequently, a fraction of BPDCN patients, who have no cutaneous manifestations, might have gone undetected/not identified. Alternatively, a bias in sample selection could also exist, as more blood and BM vs. tissue samples from complex cases are referred from other centers to our institution.

Once we grouped our cases according to the immunophenotypic maturation profile of pDC-lineage tumor cells, important differences were noted between the immature and the more mature cases, the intermediate group showing also intermediate features. Despite CD34 has been frequently considered as an exclusion marker for the diagnosis of BPDCN [11, 22], this marker was expressed in a fraction of pDC-lineage committed blast cells in around one fifth of our cases. Interestingly, these CD34<sup>+</sup> BPDCN cases systematically had a second CD34<sup>+</sup> blast cell population with a minimally differentiated (non-lymphoid) phenotype. These results support and extend on previous observations by the Hellenic Dendritic Cell

Leukemia Study Group, which found similar phenotypic and clinical characteristics to those of our Group 1 cases in 4/26 (15%) of their BPDCN patients [6]. If the WHO 2008 criteria [2] would be strictly applied, these cases would be classified as acute leukemia of ambiguous or minimally differentiated myeloid lineage, because of the lack of clear differentiation markers for cell lineages other than pDC. Of note, lymphoid lineage-committed blast cells have also been reported in a smaller proportion of these CD34<sup>+</sup> cases ([6] and personal unpublished observations). Previous studies have shown that among CD34<sup>+</sup> pDC cases, both the pDC lineage-committed and the minimally differentiated blast cell population coexisting in individual patients, share the same chromosomal aberrations [23, 24], which suggests that both cell populations arise from a common ancestral leukemia cell, and that the pDC-lineage component may represent the more differentiated blast cell compartment. Of note, in these CD34<sup>+</sup> cases, the pDC-lineage committed





**Table 4: Prognostic factors (univariate and multivariate analysis) for overall survival among aggressively-treated patients with blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms ( $n = 25$ )**

Patient features		% of cases	Median (months)	Uni <i>P</i> -value	Multi <i>P</i> -value	Hazard Ratio	95% CI
Age	≤ 15 y	16	NR	.04			
	> 15 y	84	14				
Adenopathies	No	52	22	.03			
	Yes	48	10				
Hepatomegaly	No	72	17	.03			
	Yes	28	11				
Skin involvement	No	44	23	.04			
	Yes	56	11				
Leukopenia ( $< 4 \times 10^9/l$ )	No	74	11	.05			
	Yes	26	23				
Elevated LDH ( $\geq 450U/l$ )	No	36	23	.001	.005	6.6	1.8 – 24.8
	Yes	64	10				
Increased $\beta_2$ -M ( $\geq 3$ mg/l)	No	43	42	.02			
	Yes	57	10				
ALL-type treatment	No	28	10	.03			
	Yes	72	NR				
AHSC transplantation	No	80	11	.04			
	Yes	20	NR				
Relapse	No	32	NR	.02			
	Yes	68	14				

Uni: univariate analysis, Multi: multivariate analysis, CI: confidence interval, NR: not reached, LDH: lactate dehydrogenase,  $\beta_2$ -M:  $\beta_2$ -microglobulin, ALL: acute lymphoblastic leukemia, AHSC: allogeneic hematopoietic stem cell.

Despite the here defined maturation-associated subgroups of BPDCN displayed a clearly different clinical behavior at presentation, no significant differences were observed among them as regards disease outcome, with systematically low (i.e. less than a year) OS rates. However, it should be noted that different treatments were given to these patients due to their heterogeneous clinical presentation and equivocal tumor cell features at presentation. Of note, high CR rates were obtained, regardless of the type of therapy administered. However, most cases showed an aggressive clinical course with early recurrence of the disease, resistance to therapy and a dismal prognosis with median overall survival rates of less than a year, fully in line with previous observations [25]. Despite the above, more detailed analysis of patient outcome according to therapy showed that cases treated with ALL-type protocols had a better outcome than the other patients, particularly than those who received lymphoma-type regimens (Supplementary Table 3);

these results are also in line with previous observations [6, 21], although younger patients (e.g. children) were mostly included in the group treated with ALL-like protocols. Therefore, the question remains about whether the treatment itself or age at diagnosis, would explain the apparently better prognosis of this subgroup of BPDCN patients. In this regard, it should also be emphasized that the only two adults who survived so far, were both treated with an allogeneic stem cell transplant following ALL-type therapy in one case and AML-type chemotherapy in the other patient. Despite the low number of cases included in each group, our results would reinforce previous observations suggesting a better outcome for patients treated with ALL-type and/or allogeneic stem cell transplantation [6, 7, 21, 26].

Although the potential impact of age cannot be ruled out, we may speculate that the better outcome of cases treated with ALL-type chemotherapy could be due to systematic administration of CNS prophylaxis,

since a high percentage of the cases (60%) showed CNS involvement at relapse, particularly among non-ALL-type chemotherapy treated patients (all but one, who received an ALL-type protocol). Despite the broad variety of prognostic factors -including therapy- found to be associated with patient outcome, LDH emerged as the only independent prognostic factor for aggressively-treated patients, in line with the strong predictive value of LDH in other hematological malignancies, particularly mature/peripheral lymphoid tumors [27, 28].

In summary, here we show that tumor cells from BPDCN may show a highly variable maturational profile, which translates into a heterogeneous clinical behavior ranging from that of acute leukemia to peripheral/mature lymphomas, such wide clinical spectrum potentially leading also to variable differential diagnoses and administration of distinct treatment modalities. Despite the dismal prognosis of the great majority of patients, usage of ALL-type therapy with CNS prophylaxis and/or allogeneic stem cell transplantation appears to be, among all regimens administered, the only effective ones. Overall, these results support the unique clinical and prognostic behavior of this subgroup of non-lymphoid neoplasms, which requires redefined diagnostic criteria and improved/novel [29] treatment strategies/regimens (e.g. CNS prophylaxis and consolidation regimens) for prolonged CR and survival rates.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and samples

A total of 46 patients (4 children and 42 adults; 35 males and 11 females) diagnosed with BPDCN (according to WHO 2008 criteria [2]) and who were referred to the Cytometry Service of the Cancer Research Centre of the University of Salamanca (Salamanca, Spain), were included in this study. Diagnosis was prospectively made, based on co-expression of HLA-DR<sup>++</sup> and CD123<sup>+/++</sup> (which strongly supports a plasmacytoid dendritic cell origin [11, 30]) together with CD4 positivity, dim expression of CD45 and intermediate forward scatter (FSC)/sideward scatter (SSC) values, after blast cell commitment to other myeloid and lymphoid cell lineages had been excluded by morphological, immunophenotypical and molecular analyses (e.g. germline TCR and IGH gene configurations). The vast majority of cases also showed expression of CD36, further supporting a BPDCN diagnosis in the presence of the above referred phenotype.

In every patient, bone marrow (BM), peripheral blood (PB) and/or fine-needle aspiration (FNA) tissue samples were obtained and studied at diagnosis, before any therapy had been administered. Clinical and laboratory data was retrospectively collected from the referring centers. At the moment of closing the study, median follow-up was of 7 months (range: < 1 to 104 months),

41 patients had died and 5 remained alive. The study was approved by the Ethics Committee of the Cancer Research Center, and performed following the Declaration of Helsinki. Each participant gave his informed consent prior entering the study.

Systemic therapy was administered to 32/46 patients and consisted of standard AML-type (cytarabine in combination with idarubicin, mitoxantrone or daunorubicin), acute lymphoid leukemia (ALL)-type (Spanish PETHEMA LAL-AR/2003 protocol and hyper-CVAD) [31] or lymphoma-type (i.e. C(H)OP) protocols, according to local criteria at the referring centers. The remaining patients received only palliative care based on local criteria.

### Flow cytometry immunophenotyping

Multiparameter flow cytometry immunophenotypic studies were performed on whole BM, PB and FNA samples obtained from lymphoid tissues and/or skin lesions, using multicolor [3, 4, 6–8, 11] combinations of a large panel of monoclonal antibodies (Supplementary Table 1); since 2009 these included the EuroFlow panels [32]. In all cases, samples were stained using a direct immunofluorescence technique, as described elsewhere [20]. For data acquisition, a FACSCalibur and FACSCanto II flow cytometers (Becton Dickinson Biosciences –BD–, San Jose, CA, USA) were used. The Infinicyt (Cytognos, Salamanca, Spain) software program was used for data analysis.

### Cytomorphological and histopathological analyses

Cytological analysis of May-Grünwald-Giemsa stained PB and BM smears was performed by conventional microscopy. In turn, conventional histopathological analyses were also performed in parallel for those cases showing lymph node and/or skin involvement, to further confirm tissue infiltration by pDC blast cells.

### Statistical methods

Conventional descriptive and comparative statistics – Mann-Whitney U non-parametric test (for continuous variables) and the  $\chi^2$  test (for categorical variables)- were calculated using the PASW 19 program (IBM SPSS Statistics, IBM, Armonk, NY, USA). Overall survival curves (OS) were plotted according to the Kaplan-Meier method and compared using the (one-sided) log-rank test. Multivariate Cox proportional hazard models (stepwise regression) were applied to explore the independent effect of each parameter under study (including immunophenotypical BPDCN subgrouping) on OS. Hazard ratio and 95% confidence interval were also estimated. *P* values < 0.05 were considered to be associated with statistical significance.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Carlos Fernández (University of Salamanca), Artur Paiva (Portuguese Institute of Blood and Transplant, Coimbra, Portugal), Carlota Calvo and Ana Godoy (Hospital Miguel Servet, Zaragoza, Spain), Belén Navarro (Hospital Puerta de Hierro, Madrid, Spain), José Antonio Queizán (Hospital General de Segovia, Segovia, Spain), Josefina Grande (Hospital Comarcal del Bierzo, Ponferrada, Spain), Fernando Puente (Hospital San Jorge, Huesca, Spain), Fernando Ramos (Hospital Virgen Blanca, León, Spain), Abelardo Báñez (Hospital Nuestra Señora de Sonsoles, Ávila, Spain), Isana Benet and Amparo Miguel (Hospital General Universitario, Valencia, Spain), Rosario Butrón (Hospital Punta Europa, Algeciras, Spain), Helena Bañas (Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Spain), Fernando Principe (Hospital São João, Porto, Portugal), Ángel Ramírez (Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain), Luis Perdiguer (Hospital de Alcañiz, Teruel, Spain), José Tomás Navarro (Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain), Guillermo Martín (Hospital Virgen del Puerto, Plasencia, Spain), Dolores Subirá (Hospital Universitario de Guadalajara, Spain) for their collaboration in this study.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest to disclose.

## GRANT SUPPORT

This work was supported by grants RD06/0020/0035 and RD12/0036/0048 from RETICS (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain and Fondos FEDER) and grant EDU/878/2004 from Junta de Castilla y León and Fondo Social Europeo.

## REFERENCES

1. Bueno C, Almeida J, Lucio P, Marco J, Garcia R, de Pablos JM, Parreira A, Ramos F, Ruiz-Cabello F, Suarez-Vilela D, San Miguel JF, Orfao A. Incidence and characteristics of CD4(+)/HLA DRhi dendritic cell malignancies. *Haematologica*. 2004; 89:58–69.
2. Facchetti F, Jones M, Petrella T. 2008; Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. In: WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. 4th edn. International Agency for Research on Cancer (IARC) Lyon, France: 2008; :145–7.
3. Chaperot L, Bendriss N, Manches O, Gressin R, Maynadie M, Trimoreau F, Orfeuvre H, Corront B, Feuillard J, Sotto JJ, Bensa JC, Briere F, Plumas J, Jacob MC. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2001; 97:3210–3217.
4. Lucioni M, Novara F, Fiandrino G, Riboni R, Fanoni D, Arra M, Venegoni L, Nicola M, Dallera E, Arcaini L, Onida F, Vezzoli P, Travaglino E, Boveri E, Zuffardi O, Paulli M, et al. Twenty-one cases of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: focus on biallelic locus 9p21.3 deletion. *Blood*. 2011; 118:4591–4594.
5. Menezes J, Acquadro F, Wiseman M, Gomez-Lopez G, Salgado RN, Talavera-Casanas JG, Buno I, Cervera JV, Montes-Moreno S, Hernandez-Rivas JM, Ayala R, Calasanz MJ, Larrayoz MJ, Brichs LF, Gonzalez-Vicent M, Pisano DG, et al. Exome sequencing reveals novel and recurrent mutations with clinical impact in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Leukemia*. 2014; 28:823–829.
6. Tsagarakis NJ, Kentrou NA, Papadimitriou KA, Pagoni M, Kokkini G, Papadaki H, Pappa V, Marinakis T, Anagnostopoulos NI, Vadikolia C, Anagnostopoulos A, Angelopoulou MK, Terpos E, Poziopoulos C, Anargyrou K, Rontogianni D, et al. Acute lymphoplasmacytoid dendritic cell (DC2) leukemia: results from the Hellenic Dendritic Cell Leukemia Study Group. *Leuk Res*. 2010; 34:438–446.
7. Pagano L, Valentini CG, Pulsoni A, Fisogni S, Carluccio P, Mannelli F, Lunghi M, Pica G, Onida F, Cattaneo C, Piccaluga PP, Di Bona E, Todisco E, Musto P, Spadea A, D'Arco A, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with leukemic presentation: an Italian multicenter study. *Haematologica*. 2013; 98:239–246.
8. Herling M, Jones D. CD4+/CD56+ hematodermic tumor: the features of an evolving entity and its relationship to dendritic cells. *Am J Clin Pathol*. 2007; 127:687–700.
9. Marafioti T, Paterson JC, Ballabio E, Reichard KK, Tedoldi S, Hollowood K, Dictor M, Hansmann ML, Pileri SA, Dyer MJ, Sozzani S, Dikic I, Shaw AS, Petrella T, Stein H, Isaacson PG, et al. Novel markers of normal and neoplastic human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2008; 111:3778–3792.
10. Garnache-Ottou F, Chaperot L, Biichle S, Ferrand C, Remy-Martin JP, Deconinck E, de Tailly PD, Bulabois B, Poulet J, Kuhlein E, Jacob MC, Salaun V, Arock M, Drenou B, Schillinger F, Seilles E, et al. Expression of the myeloid-associated marker CD33 is not an exclusive factor for leukemic plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2005; 105:1256–1264.
11. Garnache-Ottou F, Feuillard J, Ferrand C, Biichle S, Trimoreau F, Seilles E, Salaun V, Garand R, Lepelley P, Maynadie M, Kuhlein E, Deconinck E, Daliphard S, Chaperot L, Besegio L, Foisseau V, et al. Extended diagnostic criteria for plasmacytoid dendritic cell leukaemia. *British journal of haematology*. 2009; 145:624–636.
12. Kawai K. CD56-negative blastic natural killer-cell lymphoma (agranular CD4(+)/CD56(+)) haematodermic neoplasm?). *The British journal of dermatology*. 2005; 152:369–370.

13. Montes-Moreno S, Ramos-Medina R, Martinez-Lopez A, Barrionuevo Cornejo C, Parra Cubillos A, Quintana-Truyenque S, Rodriguez Pinilla SM, Pajares R, Sanchez-Verde L, Martinez-Torrecuadrada J, Roncador G, Piris MA. SPIB, a novel immunohistochemical marker for human blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms: characterization of its expression in major hematolymphoid neoplasms. *Blood*. 2013; 121:643–647.
14. Stenzinger A, Endris V, Pfarr N, Andrulis M, Johrens K, Klauschen F, Siebolts U, Wolf T, Koch PS, Schulz M, Hartschuh W, Goerdts S, Lennerz JK, Wickenhauser C, Klapper W, Anagnostopoulos I, et al. Targeted ultra-deep sequencing reveals recurrent and mutually exclusive mutations of cancer genes in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Oncotarget*. 2014; 5:6404–6413.
15. Julia F, Petrella T, Beylot-Barry M, Bagot M, Lipsker D, Machet L, Joly P, Dereure O, Wetterwald M, d'Incan M, Grange F, Cornillon J, Tertian G, Maubec E, Saiag P, Barete S, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: clinical features in 90 patients. *The British journal of dermatology*. 2013; 169:579–586.
16. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nature reviews*. 2002; 2:920–932.
17. Brody JP, Allen S, Schulman P, Sun T, Chan WC, Friedman HD, Teichberg S, Koduru P, Cone RW, Loughran TP Jr. Acute agranular CD4-positive natural killer cell leukemia. *Comprehensive clinicopathologic studies including virologic and in vitro culture with inducing agents*. *Cancer*. 1995; 75:2474–2483.
18. Lucio P, Parreira A, Orfao A. CD123 hi dendritic cell lymphoma: an unusual case of non-Hodgkin lymphoma. *Ann Intern Med*. 1999; 131:549–550.
19. Martin-Martin L, Almeida J, Hernandez-Campo PM, Sanchez ML, Lecrevisse Q, Orfao A. Immunophenotypic, morphologic, and functional characterization of maturation-associated plasmacytoid dendritic cell subsets in normal adult human bone marrow. *Transfusion*. 2009; 49:1692–1708.
20. Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Sanchez ML, Canizo MC, Fernandez ME, Vaquero JM, Laso FJ, Escribano L, San Miguel JF, Orfao A. Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHC II+/lineage- cells. *Clin Exp Immunol*. 1999; 118:392–401.
21. Jegalian AG, Buxbaum NP, Facchetti F, Raffeld M, Pittaluga S, Wayne AS, Jaffe ES. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm in children: diagnostic features and clinical implications. *Haematologica*. 2010; 95:1873–1879.
22. Feuillard J, Jacob MC, Valensi F, Maynadie M, Gressin R, Chaperot L, Arnoulet C, Brignole-Baudouin F, Drenou B, Duchayne E, Falkenrodt A, Garand R, Homolle E, Husson B, Kuhlein E, Le Calvez G, et al. Clinical and biologic features of CD4(+)CD56(+) malignancies. *Blood*. 2002; 99:1556–1563.
23. Vermi W, Facchetti F, Rosati S, Vergoni F, Rossi E, Festa S, Remotti D, Grigolato P, Massarelli G, Frizzera G. Nodal and extranodal tumor-forming accumulation of plasmacytoid monocytes/interferon-producing cells associated with myeloid disorders. *Am J Surg Pathol*. 2004; 28:585–595.
24. Mohty M, Jarrossay D, Lafage-Pochitaloff M, Zandotti C, Briere F, de Lamballeri XN, Isnardon D, Sainty D, Olive D, Gaugler B. Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment. *Blood*. 2001; 98:3750–3756.
25. Petrella T, Bagot M, Willemze R, Beylot-Barry M, Vergier B, Delaunay M, Meijer CJ, Courville P, Joly P, Grange F, De Muret A, Machet L, Dompnmartin A, Bosq J, Durlach A, Bernard P, et al. Blastic NK-cell lymphomas (agranular CD4+CD56+ hematodermic neoplasms): a review. *Am J Clin Pathol*. 2005; 123:662–675.
26. Roos-Weil D, Dietrich S, Boumendil A, Polge E, Bron D, Carreras E, Iriando Atienza A, Arcese W, Beelen DW, Cornelissen JJ, Kroger N, Milone G, Rossi G, Jardin F, Peters C, Rocha V, et al. Stem cell transplantation can provide durable disease control in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: a retrospective study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2013; 121:440–446.
27. Terpos E, Katodritou E, Roussou M, Pouli A, Michalis E, Delimpasi S, Parcharidou A, Kartasis Z, Zomas A, Symeonidis A, Viniou NA, Anagnostopoulos N, Economopoulos T, Zervas K, Dimopoulos MA. High serum lactate dehydrogenase adds prognostic value to the international myeloma staging system even in the era of novel agents. *Eur J Haematol*. 2010; 85:114–119.
28. Swan F Jr., Velasquez WS, Tucker S, Redman JR, Rodriguez MA, McLaughlin P, Hagemester FB and Cabanillas F. A new serologic staging system for large-cell lymphomas based on initial beta 2-microglobulin and lactate dehydrogenase levels. *J Clin Oncol*. 1989; 7:1518–1527.
29. Frankel AE, Woo JH, Ahn C, Pemmaraju N, Medeiros BC, Carraway HE, Frankfurt O, Forman SJ, Yang XA, Konopleva M, Garnache-Ottou F, Angelot-Delettre F, Brooks C, Szarek M, Rowinsky E. Activity of SL-401, a targeted therapy directed to interleukin-3 receptor, in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm patients. *Blood*. 2014; 124:385–392.
30. Munoz L, Nomdedeu JF, Lopez O, Carnicer MJ, Bellido M, Aventin A, Brunet S, Sierra J. Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica*. 2001; 86:1261–1269.
31. Ribera JM, Oriol A, Morgades M, Montesinos P, Sarra J, Gonzalez-Campos J, Brunet S, Tormo M, Fernandez-Abellan P, Guardia R, Bernal MT, Esteve J, Barba P,

Moreno MJ, Bermudez A, Cladera A, et al. Treatment of high-risk Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in adolescents and adults according to early cytologic response and minimal residual disease after consolidation assessed by flow cytometry: final results of the PETHEMA ALL-AR-03 trial. *J Clin Oncol*. 2014; 32:1595–1604.

32. van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, Rawstron A, Asnafi V, Lecrevisse Q, Lucio P, Mejstrikova E, Szczepanski T, Kalina T, de Tute R, Bruggemann M, Sedek L, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012; 26:1908–1975.





### **Artículo 3:** “La neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica muestra con frecuencia infiltración del sistema nervioso central al diagnóstico, beneficiándose de la administración de tratamiento intratecal”

**Objetivo.** Pese a que la mayor parte de los pacientes diagnosticados de neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica (NCDPB) alcanza remisión completa tras tratamiento con regímenes poliquimioterápicos agresivos, la gran mayoría de ellos recae poco tiempo después, de manera que la supervivencia global del conjunto de estos pacientes es generalmente muy corta e inferior a un año. En estos pacientes, un porcentaje significativo de las recaídas ocurre en el SNC (33%) donde, mediante técnicas (citológicas) convencionales, también se ha detectado la presencia de células tumorales al diagnóstico en un 10% de los casos. A pesar de todo lo anteriormente expuesto, en los pacientes con NCDPB actualmente no se investiga de forma sistemática la posible presencia de infiltración del SNC al diagnóstico; por el contrario, el estudio del SNC suele quedar restringido a aquellos pacientes en los que se observa sintomatología neurológica. Por consiguiente, tampoco se administra de forma rutinaria tratamiento intratecal profiláctico a pacientes con NCDPB. En este trabajo evaluamos por primera vez la incidencia de infiltración del SNC al diagnóstico en pacientes con NCDPB, además del posible efecto beneficioso sobre la supervivencia de la administración de terapia intratecal.

**Pacientes, materiales, métodos.** Mediante CMF multiparamétrica (8 colores; 10 parámetros) evaluamos la presencia de células tumorales en líquido cefalorraquídeo (LCR) estabilizado en Transfix (Cytomark, Buckingham, UK) en 13 pacientes con NCDPB. Estos casos fueron estudiados en el momento del diagnóstico (n=10) o en la recaída/progresión (n=3), y posteriormente, tras la administración de terapia intratecal. Los 10 pacientes evaluados al diagnóstico recibieron regímenes terapéuticos de tipo LLA que incluían la administración profiláctica de una dosis de terapia triple intratecal

en cada fase del tratamiento. En los pacientes en los que se detectó infiltración oculta del SNC por CMF, se administró además tratamiento intratecal hasta su negativización (ausencia de células tumorales con un nivel de sensibilidad de  $<0.001$  células tumorales/ $\mu$ l) en dos muestras de LCR consecutivas.

**Resultados.** La mayoría de los pacientes presentaba lesiones cutáneas en el momento del diagnóstico y en todos los casos el examen neurológico fue normal. Pese a la ausencia de clínica neurológica se detectaron células tumorales mediante CMF, en el LCR de 6 de los 10 pacientes evaluados al diagnóstico. El hallazgo de infiltración del SNC se asoció de forma significativa con la presencia de  $\geq 20\%$  de células tumorales de línea de CDp en MO. Los 3 casos estudiados en el momento de la recaída/progresión de la enfermedad fueron referidos debido a la aparición de sintomatología neurológica; en todos ellos (3/3) se detectó infiltración del SNC mediante CMF. Todos los pacientes evaluados al diagnóstico recibieron tratamiento intratecal y todos excepto uno permanecen vivos y en remisión completa tras una mediana de seguimiento de 20 meses. Por el contrario, los tres pacientes estudiados en recaída/progresión fallecieron al poco tiempo (mediana de 7 meses). El impacto favorable sobre la supervivencia que tuvo la administración de tratamiento intratecal en el momento del diagnóstico fue posteriormente confirmado en una serie retrospectiva de 23 pacientes con NCDPB.

**Conclusiones.** Nuestros resultados muestran por primera vez la elevada frecuencia de infiltración oculta del SNC en pacientes con NCDPB, ya en el momento del diagnóstico. Además, nuestros hallazgos sugieren que los pacientes con NCDDPB y enfermedad oculta del SNC podrían beneficiarse de los tratamientos dirigidos al SNC, sobre todo si se administran de forma temprana. Indirectamente, estos resultados también sugieren que el SNC podría actuar como santuario para las células tumorales en aquellos casos en los que se observa una presentación leucémica, dada la eficacia limitada de la mayoría de los fármacos a la hora de atravesar la barrera hematoencefálica; este reservorio de células leucémicas podría contribuir a explicar la elevada tasa de recaídas observadas en estos pacientes.



# Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm frequently shows occult central nervous system involvement at diagnosis and benefits from intrathecal therapy

Lourdes Martín-Martín<sup>1</sup>, Julia Almeida<sup>1</sup>, Helena Pomares<sup>2</sup>, Eva González-Barca<sup>2</sup>, Pilar Bravo<sup>3</sup>, Teresa Giménez<sup>4</sup>, Cecilia Heras<sup>5</sup>, José-Antonio Queizán<sup>6</sup>, Elena Pérez-Ceballos<sup>7</sup>, Violeta Martínez<sup>8</sup>, Natalia Alonso<sup>9</sup>, Carlota Calvo<sup>10</sup>, Rodolfo Álvarez<sup>11</sup>, María Dolores Caballero<sup>12</sup> and Alberto Orfao<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cancer Research Centre (IBMCC, USAL-CSIC), Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL) and Department of Medicine and Cytometry Service (NUCLEUS Research Support Platform), University of Salamanca (USAL), Salamanca, Spain

<sup>2</sup> Hematology Department, Institut Català d'Oncologia, Hospital Duran i Reynals, University of Barcelona, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Hematology Department, University Hospital of Fuenlabrada, Madrid, Spain

<sup>4</sup> Hematology Department, University Hospital Joan XXIII, Tarragona, Spain

<sup>5</sup> Hematology Department, Infanta Leonor Hospital, Madrid, Spain

<sup>6</sup> Hematology Department, Hospital of Segovia, Segovia, Spain

<sup>7</sup> Hematology Department, University Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain

<sup>8</sup> Hematology Department, Hospital of León, León, Spain

<sup>9</sup> Hematology Department, University Hospital of Santiago, Santiago de Compostela, Spain

<sup>10</sup> Hematology Department, University Hospital Miguel Servet, Zaragoza, Spain

<sup>11</sup> Hematology Department, General Yagüe Hospital, Burgos, Spain

<sup>12</sup> Hematology Department and IBSAL, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

**Correspondence to:** Alberto Orfao, email: orfao@usal.es

**Keywords:** blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm, central nervous system, intrathecal prophylaxis, ALL therapy, flow cytometry

**Received:** January 12, 2016

**Accepted:** January 21, 2016

**Published:** January 31, 2016

## ABSTRACT

Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDCN) is a rare aggressive myeloid neoplasm which shows a high rate of central nervous system (CNS) recurrence and overall survival (OS) of <1 year. Despite this, screening for CNS involvement is not routinely performed at diagnosis and intrathecal (IT) prophylaxis is not regularly administered in BPDCN. Here, we prospectively evaluated 13 consecutive BPDCN patients for the presence of CNS involvement by flow cytometry. Despite none of the patients presented with neurological symptoms, occult CNS involvement was detected in 6/10 cases evaluated at diagnosis and 3/3 studied at relapse/progression. BPDCN patients evaluated at diagnosis received IT treatment -either CNS prophylaxis ( $n = 4$ ) or active therapy ( $n = 6$ )- and all but one remain alive (median follow-up of 20 months). In contrast, all three patients assessed at relapse/progression died. The potential benefit of IT treatment administered early at diagnosis on OS and CNS recurrence-free survival of BPDCN was further confirmed in a retrospective cohort of another 23 BPDCN patients. Our results show that BPDCN patients studied at diagnosis frequently display occult CNS involvement; moreover, they also indicate that treatment of occult CNS disease might lead to a dramatically improved outcome of BPDCN.

## INTRODUCTION

Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDCN) is a rare disease -i.e. < 1% acute myeloblastic leukemia cases (AML)- with a historically dismal prognosis. Despite most BPDCN patients treated with different intensive chemotherapy regimens (e.g. CHOP, AML-type and acute lymphoblastic leukemia (ALL)-type regimens) achieve complete remission (CR), the great majority relapse early after CR, with further resistance to therapy and a fatal outcome. Of note, a significant percentage ( $\approx 30\%$ ) [1-3] of BPDCN relapses occur in the central nervous system (CNS), either as isolated CNS relapses or in the context of a systemic relapse. This is in line with the relatively high rate ( $\approx 10\%$  of cases) [1-6] of overt CNS involvement (i.e. confirmed by cytology) observed at diagnosis in patients with leukemic variant of BPDCN presenting with neurological symptoms.

Although BPDCN prognosis is extremely poor, patients treated with ALL-type regimens that include CNS prophylaxis [1-3] and/or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) [7, 8] appear to show a better outcome. Altogether, these findings suggest that occult CNS involvement might be already present at diagnosis in a significant fraction of BPDCN patients, and could contribute to explain the relatively high number of CNS recurrences [9].

Here, we prospectively evaluated for the first time the presence of CNS involvement by next generation flow cytometry (NGF) in 13 consecutive BPDCN patients studied at diagnosis ( $n = 10$ ) or at disease recurrence ( $n = 3$ ). The impact of CNS involvement and CNS-directed therapy in patient outcome was further validated in a retrospective series of 23 additional BPDCN patients.

## RESULTS AND DISCUSSION

At diagnosis, most prospectively analyzed patients showed skin lesions ( $n=10/13$ ; 77%), peripheral blood (7/13; 54%) and/or bone marrow (9/13; 69%) involvement with normal neurological physical examination ( $n=13/13$ ; 100%) and a good performance status ( $ECOG \leq 0/1$ ;  $n=12/13$ ; 92%) (Table 1). Despite this, cerebrospinal fluid (CSF) samples positive for tumor plasmacytoid dendritic cells were found in 6/10 (60%) cases studied at diagnosis –median of 11 tumor cells/ $\mu$ l (range: 0.6–47), representing 82% of the total CSF cellularity (range: 68%-95%)- in association with  $\geq 20\%$  bone marrow (BM) infiltration by tumor cells (6/6 vs. 1/4 cases, respectively;  $p=.03$ ). Except for the high rate of occult CNS involvement at diagnosis, prospectively analyzed here for the first time, the above described pattern of extranodal disease involvement has been previously reported as typical for BPDCN patients [2, 4, 5].

Regarding the 3 patients referred at relapse (5, 7 and 14 months after diagnosis), none had been screened for

CNS disease (nor received CNS therapy) at diagnosis; all 3 had their CSF referred because of the onset of neurological symptoms, consisting of seizure in two patients and the presence of symptoms and signs of intracranial hypertension together with involvement of cranial nerves in the remaining case. They all showed CNS involvement by NGF with  $>50\%$  tumor cells (958, 5 and 46 tumor cells/ $\mu$ l, respectively). These results confirm previous observations about the relatively high rate of overt CNS involvement in BPDCN, particularly at relapse [1-3]; in addition, these results also support the notion that many BPDCN patients may already have occult CNS disease at diagnosis, in the absence of neurological symptoms.

Despite BPDCN patients have been found to show already at diagnosis, a rather high rate ( $\approx 10\%$ ) [1-6] of CNS involvement by conventional CSF cytology (e.g. similar to ALL patients), they are neither routinely screened for CNS involvement, nor receive CNS-directed therapy. This is even more striking because CNS relapses have been recurrently reported among BPDCN patients at relapse at higher frequencies than at diagnosis ( $\approx 30\%$ ) [1-3]. Among other reasons, this might be due to the rarity of the disease –and hence the limited experience with these patients–, as well as the inclusion of BPDCN as a myeloid malignancy in the WHO classification [10], where CNS involvement at diagnosis is uncommon ( $<5\%$  of patients) [11] and therefore, systematic CSF screening is not performed at diagnosis, in the absence of neurological symptoms. Moreover, NGF has not been routinely applied for the diagnostic screening of CNS involvement in BPDCN patients, despite its higher sensitivity over conventional cytology for detecting tumor cells on stabilized CSF samples [12, 13], and the fact that NGF can detect CNS disease before clinical symptoms emerge [14].

Of note, follow-up CSF samples obtained after triple intrathecal therapy (TIT) showed absence of tumor cells in 6/6 CSF<sup>+</sup> cases studied at diagnosis, either after one -5/6 cases (83%)- or 4 doses of therapy (6/6 cases; Table 1). At the moment of closing this study, 5/6 cases remained CNS-disease free, in continuous CR; the remaining patient (case#4 in Table 1) had an isolated CNS relapse 6 months after diagnosis. Upon relapse, the patient received intrathecal (IT) chemotherapy, a single dose being sufficient to re-induce CR with NGF-negative CSF; subsequently, he underwent an AHSCT and remains disease-free for  $>2$  years. At the moment of closing this study, only 1/10 patients studied at diagnosis had died in CR (case #5 in Table 1), the other 9 patients remaining alive in CR after a median follow-up of 20 months (range: 6–48 months). In contrast, those three patients studied at disease recurrence suffered disease progression and death, despite IT therapy was administered in 2/3 cases (median overall survival (OS): 7 months) (Table 1). Overall, these findings suggest that BPDCN patients with occult CNS involvement at diagnosis might specifically benefit from

**Table 1: BPDCN patients included in the prospective cohort (n=13): Disease features at diagnosis and follow-up including patient outcome**

Patient code	Gender	Age	EC OG	Skin lesions	BM % of blast cells at diagnosis	PB % of blast cells at diagnosis	CSF involvement at diagnosis	N. of blast cells/μl detected by NGF in CSF	CC result in CSF*	Systemic chemo-therapy	IT therapy at diagnosis	Response to chemo-therapy	Relapse	Site of relapse	Time (months) to relapse/ progression	Positive CSF*	Time from diagnosis to IT therapy (days)	Type of IT therapy	N. of IT doses for CSF clearance	CNS relapse/ progression	AHSCT	Disease status	Current status	Cause of death	Overall survival (months)
NO CSF involvement at diagnosis by NGF (n=4)																									
#3	M	60	1	Yes	29	4	No	0	Negative	LAL-07FRAIL	Yes	CR	No			No	2	TIT	NA	No	Yes	CR	Alive		38
#6	F	57	0	Yes	0	0	No	0	NE	LAL-AR2011	Yes	CR	Yes	Cutaneous	7	No	6	TIT	NA	No	Yes	SD	Alive		27
#9	M	67	0	Yes	0	0	No	0	NE	LAL-07FRAIL	Yes	CR	No			No	29	TIT	NA	No	No	CR	Alive		20
#11	M	73	0	Yes	2	0	No	0	NE	LAL-07FRAIL	Yes	CR	No			No	14	TIT	NA	No	No	CR	Alive		9
Subtotal	3M/1F	64 (57-73)	0	4/4	1 (0-29)	0 (0-4)	0/4	0	0/1		4/4	4/4 CR	1/4			0/4	10 (2-29)		NA	0/4	2/4	3/4 CR	4/4 Alive		24 (9-38)
CSF involvement at diagnosis by NGF (n=6)																									
#1	M	11	NR	No	80	83	Yes	5.1	NE	LAL-AR1993	Yes	CR	No			Yes	11	TIT	1	No	No	CR	Alive		48
#4	M	16	0	Yes	94	68	Yes	0.6	Negative	LAL-AR2003	Yes	CR	Yes	Leptom	5	Yes	2	TIT & Lip AraC	1	Yes	Yes	CR	Alive		34
#5	M	67	0	Yes	80	45	Yes	2.2	Positive	LAL-AR2011	Yes	CR	No			Yes	3	TIT	1	No	No	CR	EXITUS	Sepsis	2
#10	M	71	1	Yes	88	0	Yes	6.4	Negative	LAL-07FRAIL	Yes	CR	No			Yes	5	TIT	4	No	No	CR	Alive		15
#12	F	79	2	No	68	4	Yes	46.6	NE	LAL-07FRAIL	Yes	CR	No			Yes	7	TIT & Lip AraC	1	No	No	CR	Alive		7
#13	M	66	0	Yes	74	28	Yes	6.1	NE	Hyper-CVAD	Yes	CR	No			Yes	6	TIT	1	No	No	CR	Alive		6
Subtotal	5M/1F	67 (11-79)	0	4/6	80 (68-94)	37 (0-83)	6/6	5.6 (0.6-46.6)	1/3		6/6	6/6 CR	1/6			6/6	6 (2-11)		1 (1-44)	1/6	1/6	6/6 CR	5/6 Alive		11 (2-48)
CSF involvement at relapse/progression by NGF (not evaluated at diagnosis; n=3)																									
#2	M	58	0	Yes	0	0	NE	46.3	NE	No treatment-CHOP at PD	No	PD			14	Yes	426	HD MTX/AraC & Lip AraC	NC	Yes	No	PD	EXITUS	PD	19
#7	M	78	1	No	94	33	NE	958.1	NE	CYC & PRED	No	PD			5	Yes	173	NA	NA	Yes	No	PD	EXITUS	PD	5
#8	M	75	0	Yes	0	0	NE	4.5	Positive	FLUGAZA	No	SD	Yes	BM, nodal and leptom	7	Yes	226	Lip AraC	1	Yes	No	SD	EXITUS	PD	7
Subtotal	3M/0F	75	0	2/3	0	0	NE	46.3	1/1		0/3	0/3 CR	1/1		7	3/3	226			3/3	0/3	0/3 CR	0/3 Alive		7
Total n=13	11M/2F	67 (11-79)	0	10/13	68 (0-94)	4 (0-83)	6/10	6.1 (0.6-958.1)	2/5		10/13	10/13	3/11		7 (5-14)	9/13	7 (2-426)		1	4/13	3/13	9/13 CR	9/13 Alive		15 (2-48)
Patients that received IT prophylaxis/therapy at diagnosis: Prospective vs validation cohort comparison																									
Prospective (n=10)	8M/2F	67		8/10	71	4	6/10	5.6	1/4	10 ALL-type	10/10	10/10 CR	2/10	1/2 CNS	6	6/10	6			1/10	3/10	9/10 CR	9/10 Alive		18
Validation (n=5)	3M/2F	31		2/5	73	0	2/2	NE	2/2	4/5 ALL-type	5/5	5/5 CR	2/5	2/2 NR	9	2/5	≤15			0/4	2/5	3/5 CR	3/5 Alive		22
P value	NS	0.03		NS	NS	NS	NS			NS	NS	NS	NS		NS	NS	0.01			NS	NS	NS	NS		NS

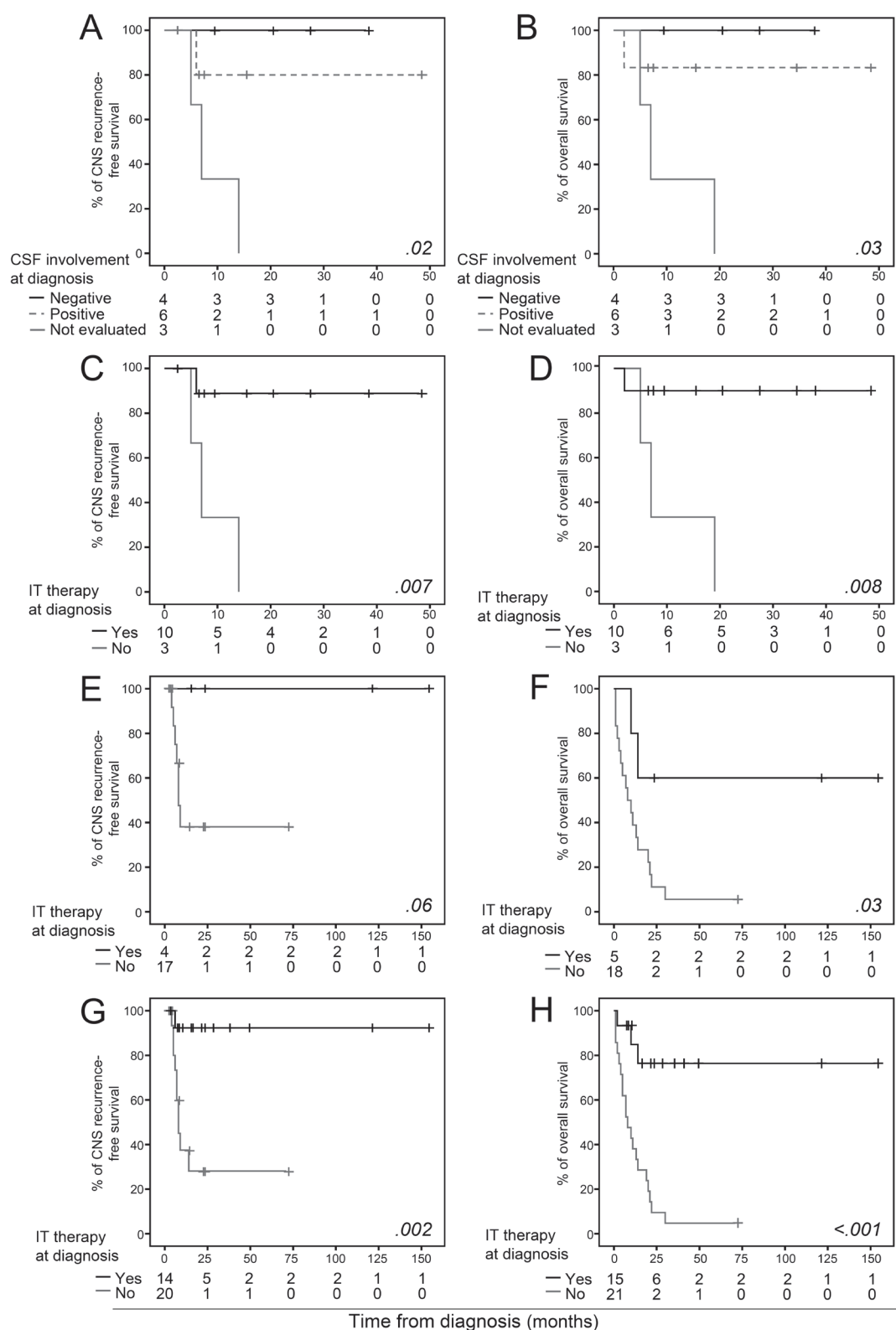
ECOG: Eastern cooperative oncology group performance status; BM: Bone marrow; PB: Peripheral blood; CSF: Cerebrospinal fluid; NGF: Next generation flow cytometry; CC: Conventional cytology; IT: Intrathecal; CNS: Central nervous system; AHSCT: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; M: Male; F: Female; NE: Not evaluated; PD: Progressive disease; CYC & PRED: Cyclophosphamide and prednisone; PD: Progressive disease; CR: Complete remission; SD: Stable disease; Leptom: Leptomeningeal; TIT: Triple intrathecal therapy (methotrexate cytarabine and hydrocortisone); Lip: Liposomal; AraC: cytarabine; HD MTX: High dose methotrexate; NA: Not applicable; NC: No clearance of CSF observed; ALL: Acute lymphoblastic leukemia; NR: Not reported; NS: Not statistically significant. #Due to the confirmed superiority of NGF versus CC in detecting occult leptomeningeal disease[12], and the limited volume of available CSF sample, CC evaluation was not systematically performed in parallel \*At any time (diagnosis or follow-up). Patients were grouped according to their CSF status at diagnosis. Results in the summary groups are expressed as number of cases from all cases within the group (for categorical variables) or as median (for continuous variables) and minimum and maximum values. All the patients had a normal neurological physical examination at diagnosis. 10 were screened for parenchymal involvement with a negative result in all these cases. All but case #7 received IT treatment at some point of the disease but none CNS radiotherapy. "LAL-XXX" (NCT01358201, NCT00853008 and [21]) and Hyper-CVAD are ALL-type protocols, CHOP is a NHL-type protocol and FLUGAZA (NCT02319135) is an AML-type protocol. CYC & PRED is a palliative regimen.

CNS-directed IT therapy, particularly if administered (early) at diagnosis; in line with this, early administration of TIT translated into a significantly better outcome and prolonged survival versus cases who did not receive CNS prophylaxis/therapy at diagnosis and presented with CNS-recurrent disease (Figure 1C and 1D).

In order to further validate our results, a series of 23 BPDCN patients previously reported in the literature [1] -and recruited in an earlier time period-, was retrospectively analyzed; of note, no major differences were observed between the two cohorts (prospectively vs. retrospectively analyzed patients) in terms of disease features and outcome (Table 1). Five of these 23 patients received IT prophylaxis at diagnosis and 4/23 received CNS-directed therapy at relapse/progression (Table 2). In this independent validation cohort, patients who did

receive IT prophylaxis at diagnosis also had prolonged CNS recurrence-free survival (CNS-RFS) ( $p=.06$ ) and OS ( $p=.03$ ) (Figure 1E and 1F). Univariate analysis of prognostic factors performed in the whole patient cohort ( $n=36$ ) showed a favorable impact on CNS-RFS and/or OS for children ( $p>.05$ ;  $p=.03$ ), patients receiving ALL-type therapy ( $p=.01$ ;  $p=.002$ ), AHSCT ( $p>.05$ ;  $p=.003$ ) and IT prophylaxis/treatment at diagnosis ( $p=.002$ ;  $p<.001$ ) (Figure 1G and 1H), the later variable emerging as the only independent (favorable) prognostic factor for CNS-RFS ( $p=.02$ , hazard ratio [HR]=11.2, 95% confidence interval [CI]: 1.4 – 88.8) and OS ( $p=.001$ , HR=7.6, 95% CI: 2.2 – 25.9).

The high rate of CNS involvement found in our study strongly suggests that the CNS could be a persistent blast-cell sanctuary in BPDCN patients with leukemic



**Figure 1: Prognostic impact of (occult) CSF involvement and administration of IT therapy at diagnosis in BPCDN patients.** CNS-RFS (panels A, C, E and G) and OS (panels B, D, F and H) curves are separately shown for the prospective cohort (panels A, B, C and D), the validation cohort (panels E and F) and the combined (prospective and validation) cohort (panels G and H).

**Table 2: BPDCN patients included in the validation cohort (n=23): Disease features at diagnosis and follow-up including patient outcome**

Patient code	Gender	Age	Skin lesions	BM % of blast cells at diagnosis	PB % of blast cells at diagnosis	CSF involvement at diagnosis	Systemic chemotherapy type regimen	Response to chemotherapy	Relapse	Site of relapse	Time (months) to relapse/progression	Positive CSF*	Time from diagnosis to IT therapy (days)	CNS treatment	CNS relapse/progression	AHSCT	Current status	Cause of death	Overall survival (months)
<b>NO CNS IT prophylaxis administered at diagnosis (n=18)</b>																			
#4R	M	63	No	58	8	NE	AML-type	CR	Yes	CNS	6	Yes	183	TIT	Yes	No	EXITUS	PD	10
#6R	M	76	Yes	0	0	NE	NHL-type	CR	Yes	Skin	5	No			No	No	EXITUS	PD	13
#8R	M	70	Yes	70	80	NE	ALL-type	CR	Yes	CNS, BM	8	Yes	244	TIT & radiotherapy	Yes	No	EXITUS	PD	14
#9R	M	10	Yes	83	15	NE	AML-type	CR	Yes	NR	10	No			NR	No	EXITUS	PD	11
#11R	F	34	No	99	0	NE	AML-type	CR	No			No			No	Yes	EXITUS	AHSCT complications	7
#19R	M	81	Yes	98	0	NE	NHL-type	CR	Yes	CNS, skin and lymph nodes	7	Yes			Yes	No	EXITUS	PD	8
#23R	M	81	Yes	75	0	NE	ALL-type	ED				No			No	No	EXITUS	Sepsis	2
#29R	M	78	No	65	35	NE	AML-type	ED				No			No	No	EXITUS	TreatTox	1
#31R	M	64	Yes	82	66	NE	NHL-type	CR	Yes	CNS, BM	9	Yes	397	TIT & Liposomal AraC	Yes	No	EXITUS	PD	20
#33R	M	72	Yes	81	0	NE	NHL-type	NR			4	Yes			Yes	No	EXITUS	PD	4
#38R	M	71	Yes	82	47	NE	NHL-type	ED			3	No			No	No	EXITUS	PD	3
#40R	M	79	Yes	25	0	NE	NHL-type	CR	Yes	NR	22	No			No	No	EXITUS	PD	22
#42R	M	70	Yes	88	2	NE	ALL-type	ED				No			No	No	EXITUS	Sepsis	1
#58R	F	54	Yes	60	40	NE	AML-type	ED				No			No	No	EXITUS	TreatTox	1
#59R	M	46	Yes	90	10	NE	NHL-type	CR	Yes	CNS	5	Yes			Yes	No	EXITUS	PD	5
#61R	M	52	No	58	12	NE	AML-type	CR	No			No			No	Yes	Alive		71
#63R	M	42	No	85	39	NE	NHL-type	CR	Yes	CNS, BM	8	Yes	230		Yes	No	EXITUS	PD	30
#64R	F	45	No	75	57	NE	AML-type	CR	No			No			No	No	EXITUS	Sepsis	21
Subtotal	15M/3F	67 (10-81)	12/18	78 (0-99)	11 (0-80)	18 NE	3/18 ALL-type	12/18 CR	9/12	6/9 CNS	7 (3-22)	7/18	237 (183-397)		7/17	2/18	1/18 Alive		9 (1-71)
<b>CNS IT prophylaxis administered at diagnosis(n=5)</b>																			
#12R	F	31	No	45	0	NE	ALL-type	CR	No			No	≤15	TIT	No	Yes	Alive		153
#13R	M	12	Yes	73	0	NE	ALL-type	CR	No			No	≤15	TIT	No	Yes	Alive		22
#28R	M	53	Yes	76	0	NE	ALL-type	CR	Yes	NR	10	No	15	MTX & AraC	No	No	EXITUS	PD	14
#35R	M	8	No	85	0	Yes	ALL-type	CR	No			Yes	≤15	MTX & Dex	No	No	Alive		120
#44R	F	47	No	73	69	Yes	AML-type	CR	Yes	NR	8	Yes	15	AraC	NR	No	EXITUS	PD	10
Subtotal	3M/2F	31 (8-53)	2/5	73 (45-85)	0 (0-69)	2/2	4/5 ALL-type	5/5 CR	2/5		9 (8-10)	2/5	≤15		0/4	2/5	3/5 Alive		22 (10-153)
P value#	NS	0.02	NS	NS	NS		0.02	NS	NS		NS	NS	0.007		NS	NS	0.02		0.03

BM: Bone marrow; PB: Peripheral blood; CSF: Cerebrospinal fluid; IT: Intrathecal; CNS: Central nervous Sytem; AHSCT: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; M: Male; F: Female; NE: Not evaluated; ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia; NHL: Non-Hodgkin Lymphoma; AML: Acute Myeloblastic Leukemia; CR: Complete remission; ED: Early death; SD: Stable disease; NR: Not reported; TIT: Triple intrathecal therapy (Methotrexate cytarabine and hydrocortisone); AraC: Cytarabine; MTX: Metothrexate; Dex: Dexamethasone; PD: Progressive disease; TreatTox: Treatment toxicity; NS: Not statistically significant. Results in the summary groups are expressed as number of cases from all cases within the group or as median. \*At any time (diagnosis or follow-up) #CNS IT prophylaxis administration at diagnosis versus not.

presentation, due to the limited power of cytostatic drugs to cross the blood-brain barrier into the CSF and brain parenchyma [15]. This reservoir of leukemic cells may also contribute to BM/systemic disease recurrence. Longer survival rates observed in AHSCT BPDCN patients [7, 8], irrespective of IT medication administration, might be explained by the benefit of the antileukemic effect of donor allogeneic cells [16], able to circulate systemically and cross the blood-brain barrier. Unfortunately, AHSCT is not exempt from relapses ( $\approx 1/3$  of patients) [7, 8], it cannot overcome the poor disease status beyond the first CR [7], and toxicity-related mortality is high [17]. Additionally, many patients are elderly or unfit subjects to undergo such an intensive therapeutic approach.

Recently, SL-401, a novel targeted therapy directed to the interleukin-3 receptor, has shown positive results on BPDCN patients with skin confined disease, whereas long-term benefit has not yet been observed in patients with the leukemic variant/phase of the disease [18]. No comparison can be established in terms of CNS relapses between both approaches (SL-401 vs. IT prophylaxis) since patients

showing CNS involvement are excluded from the study (NCT02113982) and sites of relapse/progression after SL-401 administration have not been detailed [18, 19]. Nonetheless, evaluation of IT injection of this targeted therapy will be of great interest, particularly in CNS relapses.

To the best of our knowledge, this is the first study reporting a strikingly high frequency of occult CNS involvement at diagnosis in BPDCN patients, and the potential benefit of CNS-directed therapy to reverse the poor outcome of BPDCN patients,. Indirectly, our results also suggest that occult CNS disease might contribute to explain the higher frequency of recurrences (e.g. CNS) observed in these patients, despite their high CR rates. Further prospective studies on larger BPDCN patient cohorts studied at diagnosis are necessary to confirm our findings.



## MATERIALS AND METHODS

### Ethics statement

The study was approved by the Ethics Committee of the Cancer Research Center, and performed following the Declaration of Helsinki. Each participant gave his/her informed consent prior entering the study.

### Patients and samples

Forty-one CSF samples from 13 consecutive BPDCN patients (11 males and 2 females; median age: 67 years, range: 11-79 years) were evaluated for the presence of CNS involvement by NGF. Cases were evaluated at diagnosis ( $n = 10$ ) or at relapse/progression ( $n = 3$ ) and subsequently, after IT therapy. Diagnosis of BPDCN was based on previously reported recommendations [10], including expression of markers claimed to be mandatory to allocate blast cells to the plasmacytoid dendritic cell lineage [20], by either flow cytometry or immunohistochemistry of peripheral blood specimens, BM samples or cutaneous lesions. The 10 patients studied at diagnosis received high-risk ALL-type treatment, based on the Spanish PETHEMA protocols (NCT01358201, NCT00853008 and [21])( $n = 9$ ) or HyperCVAD therapy ( $n = 1$ ), including one dose of TIT as CNS prophylaxis at each treatment phase (Table 1). For CSF-positive cases, additional IT treatment was given -TIT every 72h ( $n = 4$ ) or liposomal cytarabine (50mg) every two weeks ( $n = 2$ )- until two consecutive CSF-negative samples were obtained. In turn, patients with recurrent disease ( $n = 3$ ) received AML-type or NHL-type (CHOP) therapy (Table 1).

In order to validate the impact of CNS involvement and CNS-directed therapy on patient outcome, an independent validation cohort of 23 BPDCN treated with ALL- ( $n = 7$ ), AML- ( $n = 8$ ) or NHL-type ( $n = 8$ ) therapeutic regimens was retrospectively analyzed [1]. The intrathecal treatment administered to these patients is detailed in Table 2.

Multiparameter NGF immunophenotypic studies were performed on Transfix™-stabilized CSF samples (Cytomark, Buckingham, UK) following the EuroFlow panels and protocols [12, 22]. Data analysis was performed with the Infinicyt software (Cytognos, Salamanca, Spain). The lower cut-off for CNS involvement was defined as a cluster  $\geq 10$  events with the appropriate phenotype, based on a 10-parameter tube ( $\geq 0.001$  cells/ $\mu$ l).

### Statistical analyses

The Mann-Whitney U (for continuous variables) and the  $\chi^2$  tests (for categorical variables) were used to determine the statistical significance of differences observed between groups (PASW 19 statistical software, IBM SPSS Statistics, IBM, Armonk, NY, USA). OS and CNS-RFS curves were plotted according to the method of Kaplan-Meier and compared using the (one-sided) log-rank test. Those variables showing prognostic value in the univariate analysis were also evaluated by multivariate analysis using a Cox stepwise regression model. Statistically significance was set at p values  $< .05$ .

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Antonio López (University of Salamanca, Spain), Mary Luz Amigo (Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain), Belén Navarro (Hospital Puerta de Hierro, Madrid, Spain), Fernando Principe (Hospital Sao Joao, Oporto, Portugal) and Berta Valverde (Hospital Dr. Carlos Sáenz Herrera, San José, Costa Rica), for their contribution to this work.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest to disclose.

## GRANT SUPPORT

This work was supported by grants RD06/0020/0035 and RD12/0036/0048 from RETICS (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain and Fondos FEDER) and grant EDU/878/2004 from Junta de Castilla y León and Fondo Social Europeo.

## REFERENCES

1. Martin-Martin L, Lopez A, Vidriales B, Caballero MD, Rodrigues AS, Ferreira SI, Lima M, Almeida S, Valverde B, Martinez P, Ferrer A, Candeias J, Ruiz-Cabello F, Buadesa JM, Sempere A, Villamor N, et al. Classification and clinical behavior of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms according to their maturation-associated immunophenotypic profile. *Oncotarget*. 2015; 6:19204-19216.
2. Feuillard J, Jacob MC, Valensi F, Maynadie M, Gressin R, Chaperot L, Arnoulet C, Brignole-Baudouin F, Drenou B, Duchayne E, Falkenrodt A, Garand R, Homolle E, Husson B, Kuhlein E, Le Calvez G, et al. Clinical and biologic features of CD4(+)CD56(+) malignancies. *Blood*. 2002; 99:1556-1563.

3. Pagano L, Valentini CG, Pulsoni A, Fisogni S, Carluccio P, Mannelli F, Lunghi M, Pica G, Onida F, Cattaneo C, Piccaluga PP, Di Bona E, Todisco E, Musto P, Spadea A, D'Arco A, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with leukemic presentation: an Italian multicenter study. *Haematologica*. 2013; 98:239-246.
4. Tsagarakis NJ, Kentrou NA, Papadimitriou KA, Pagoni M, Kokkini G, Papadaki H, Pappa V, Marinakis T, Anagnostopoulos NI, Vadikolia C, Anagnostopoulos A, Angelopoulou MK, Terpos E, Poziopoulos C, Anargyrou K, Rontogianni D, et al. Acute lymphoplasmacytoid dendritic cell (DC2) leukemia: results from the Hellenic Dendritic Cell Leukemia Study Group. *Leuk Res*. 2010; 34:438-446.
5. Hashikawa K, Niino D, Yasumoto S, Nakama T, Kiyasu J, Sato K, Kimura Y, Takeuchi M, Sugita Y, Hashimoto T and Ohshima K. Clinicopathological features and prognostic significance of CXCL12 in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *J Am Acad Dermatol*. 2012; 66:278-291.
6. Pemmaraju N, Kantarjian HM, Cortes JE, Duvic M, Khoury JD, Patel K, Daver N, O'Brien S, Pierce S, Garcia-Manero G, Jabbour E, Jain N, Faderl S, Thomas D, Frankel AE, Qazilbash MH, et al. Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm (BPDCN): A Large Single-Center Experience: Analysis of Clinical and Molecular Characteristics and Patient Outcomes. *Blood*. 2015; 126:3746-3746.
7. Aoki T, Suzuki R, Kuwatsuka Y, Kako S, Fujimoto K, Taguchi J, Kondo T, Ohata K, Ito T, Kamoda Y, Fukuda T, Ichinohe T, Takeuchi K, Izutsu K and Suzumiya J. Long-term survival following autologous and allogeneic stem cell transplantation for blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Blood*. 2015; 125:3559-3562.
8. Roos-Weil D, Dietrich S, Boumendil A, Polge E, Bron D, Carreras E, Iriando Atienza A, Arcese W, Beelen DW, Cornelissen JJ, Kroger N, Milone G, Rossi G, Jardin F, Peters C, Rocha V, et al. Stem cell transplantation can provide durable disease control in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: a retrospective study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2013; 121:440-446.
9. Jegalian AG, Buxbaum NP, Facchetti F, Raffeld M, Pittaluga S, Wayne AS and Jaffe ES. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm in children: diagnostic features and clinical implications. *Haematologica*. 2010; 95:1873-1879.
10. Facchetti F, Jones M and Petrella T. (2008). Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. In: Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al., ed. WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. (Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC)), pp. 145-147.
11. Rees JK, Gray RG, Swirsky D and Hayhoe FG. Principal results of the Medical Research Council's 8th acute myeloid leukaemia trial. *Lancet*. 1986; 2:1236-1241.
12. Quijano S, Lopez A, Manuel Sancho J, Panizo C, Deben G, Castilla C, Antonio Garcia-Vela J, Salar A, Alonso-Vence N, Gonzalez-Barca E, Penalver FJ, Plaza-Villa J, Morado M, Garcia-Marco J, Arias J, Briones J, et al. Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *J Clin Oncol*. 2009; 27:1462-1469.
13. Bromberg JE, Breems DA, Kraan J, Bikker G, van der Holt B, Smitt PS, van den Bent MJ, van't Veer M and Gratama JW. CSF flow cytometry greatly improves diagnostic accuracy in CNS hematologic malignancies. *Neurology*. 2007; 68:1674-1679.
14. Hegde U, Filie A, Little RF, Janik JE, Grant N, Steinberg SM, Dunleavy K, Jaffe ES, Abati A, Stetler-Stevenson M and Wilson WH. High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology. *Blood*. 2005; 105:496-502.
15. Pistoia V and Raffaghello L. Disclosing the mysteries of the central nervous system sanctuary for acute lymphoblastic leukemia cells. *Leuk Res*. 2011; 35:699-700.
16. Aoki J, Ishiyama K, Taniguchi S, Fukuda T, Ohashi K, Ogawa H, Kanamori H, Eto T, Iwato K, Sakamaki H, Morishima Y, Nagamura T, Atsuta Y and Takami A. Outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia patients with central nervous system involvement. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; 20:2029-2033.
17. Leclerc M, Peffault de Latour R, Michallet M, Blaise D, Chevallier P, Rohrlich P-S, Turlure P, Nguyen S, Jardin F, Yakoub-Agha I, Moukhtari L, Raus N and Maury S. Reduced Intensity Versus Myelo-Ablative Conditioning Regimen before Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm: A Retrospective Study of the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy (SFGM-TC). *Blood*. 2015; 126:3208-3208.
18. Frankel AE, Woo JH, Ahn C, Pemmaraju N, Medeiros BC, Carraway HE, Frankfurt O, Forman SJ, Yang XA, Konopleva M, Garnache-Ottou F, Angelot-Delettre F, Brooks C, Szarek M and Rowinsky E. Activity of SL-401, a targeted therapy directed to interleukin-3 receptor, in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm patients. *Blood*. 2014; 124:385-392.
19. Sweet KL, Pemmaraju N, Lane AA, Stein AS, Vasu S, Blum W, Rizzieri DA, Wang ES, Rowinsky EK, Szarek M, Brooks CL, Disalvatore S, Liu D, Duvic M, Schwartz JD and Konopleva M. Lead-in Stage Results of a Pivotal Trial of SL-401, an Interleukin-3 Receptor (IL-3R) Targeting Biologic, in Patients with Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm (BPDCN) or Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood*. 2015; 126:3795-3795.
20. Garnache-Ottou F, Feuillard J, Ferrand C, Biichle S, Trimoreau F, Seilles E, Salaun V, Garand R, Lepelletier P, Maynadie M, Kuhlein E, Deconinck E, Daliphard S, Chaperot L, Beseggio L, Foisseaude V, et al. Extended diagnostic criteria for plasmacytoid dendritic cell

leukaemia. *British journal of haematology*. 2009; 145:624-636.

21. Ribera JM, Ortega JJ, Oriol A, Bastida P, Calvo C, Perez-Hurtado JM, Gonzalez-Valentin ME, Martin-Reina V, Molines A, Ortega-Rivas F, Moreno MJ, Rivas C, Egurbide I, Heras I, Poderos C, Martinez-Revuelta E, et al. Comparison of intensive chemotherapy, allogeneic, or autologous stem-cell transplantation as postremission treatment for children with very high risk acute lymphoblastic leukemia: PETHEMA ALL-93 Trial. *J Clin Oncol*. 2007; 25:16-24.
22. van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, Rawstron A, Asnafi V, Lecomte Q, Lucio P, Mejstrikova E, Szczepanski T, Kalina T, de Tute R, Brüggemann M, Sedek L, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012; 26:1908-1975.



# Discusión



A pesar de la baja incidencia de las neoplasias de célula dendrítica plasmocitoide, su curso clínico agresivo y el mal pronóstico asociado a esta enfermedad<sup>189-193</sup> han motivado que en la última década se haya incrementado considerablemente el interés en el estudio de su biología y manejo clínico. Este interés se ve reflejado en la publicación reciente de varias series de pacientes<sup>156,190-192,211,240,248,260</sup>. En conjunto, estos trabajos ponen de manifiesto que la enfermedad tiene un comportamiento heterogéneo, tanto desde el punto de vista clínico, como fenotípico y genético. Todo ello, unido a la ausencia de marcadores específicos, dificulta su diagnóstico<sup>190,192,209,240,243</sup>. Pese a lo anteriormente expuesto, hasta el momento de iniciar este trabajo doctoral no se había tratado de relacionar la heterogeneidad de la neoplasia con aspectos biológicos de las células tumorales (p. ej. su estadio de diferenciación) que han demostrado gran utilidad en otras hemopatías malignas<sup>273-275</sup>, en las que se considera que el componente neoplásico refleja las características de una célula normal bloqueada en estadios madurativos concretos, que se asocian con patrones específicos de comportamiento clínico y respuesta al tratamiento<sup>276-278</sup>. En general, en las hemopatías malignas linfoides T y B, y en las leucemias mieloides, el análisis de las características fenotípicas de la célula normal ha proporcionado una referencia para la caracterización fenotípica de su variante neoplásica, ya que buena parte de esas características se mantienen en la contrapartida celular tumoral<sup>273-275</sup>.

Al iniciar este trabajo ya se conocía que la NCDPB tiene su origen en el precursor de la célula dendrítica plasmocitoide<sup>194-196,200</sup>. No obstante, en ese momento se desconocía cuál era el patrón de diferenciación de estas células en la MO, y no se disponía, por tanto, de una referencia de los perfiles fenotípicos de normalidad de los precursores de CDp. Por ello, nos propusimos como primer objetivo de este trabajo identificar los precursores de CDp de médula ósea de adultos sanos y caracterizar fenotípica y funcionalmente sus diferentes estadios madurativos, desde el precursor CD34<sup>+</sup> ya comprometido a la línea de CDp, hasta la CDp más madura identificable en

MO. Con este objetivo pretendíamos establecer una referencia de normalidad aplicable al estudio de la NCDPB.

Una vez establecidos los principales cambios fenotípicos asociados a la maduración normal de los precursores de CDp de MO, y conociendo la gran heterogeneidad de las NCDPB, nos planteamos la posibilidad de que el grado de maduración de la célula neoplásica, definido en base al conocimiento de los patrones madurativos normales, podría estar relacionado con las distintas formas de presentación clínica de la enfermedad, e incluso, condicionar el comportamiento de la misma en lo que a pronóstico y supervivencia se refiere. Como hemos mencionado repetidamente a lo largo de este trabajo, la NCDPB tiene diferentes formas clínicas de presentación<sup>157,190,192,209</sup>, sin que por el momento se conozcan cuáles son los factores o circunstancias que las condicionan, a la vez que seguimos sin haber identificado factores pronósticos biológicos que determinen la evolución clínica de los pacientes. Por ello, nuestro segundo objetivo se centró en investigar la posible relación existente entre el estadio madurativo de la célula tumoral de la NCDPB y las características clínicas y biológicas de la enfermedad al diagnóstico, su evolución y pronóstico.

Actualmente sabemos que, pese a la gran heterogeneidad clínico-biológica de la NCDPB, el pronóstico de la enfermedad es en general adverso, de tal manera que la supervivencia de la inmensa mayoría de los pacientes sigue siendo inferior al año<sup>190-192,240</sup>. De forma característica, la enfermedad suele responder a distintas pautas de tratamiento quimioterápico de inducción administradas con intención curativa, con los que la mayor parte de los casos alcanza remisión completa. Desafortunadamente, esta no es duradera y la mayoría de los pacientes irremediabilmente recaen. Un buen número de estas recaídas ocurre en el SNC ( $\approx 30\%$ )<sup>189,192</sup>, motivo por el cual, en varios trabajos, se recomienda realizar profilaxis del SNC en estos pacientes<sup>145,212,221</sup>. No obstante, no se conoce de forma fehaciente si el tratamiento profiláctico intratecal administrado en el momento del diagnóstico estaría indicado en todos los pacientes, ya que no se ha realizado una evaluación sistemática del estado del SNC al diagnóstico, mediante técnicas de elevada sensibilidad y especificidad para detectar infiltración del

LCR por células neoplásicas. A este respecto, trabajos previos realizados en muestras de LCR de pacientes con linfomas B agresivos obtenidas en el momento del diagnóstico, independientemente de la existencia o no de manifestaciones neurológicas, han demostrado que la CMF de alto rendimiento constituye una aproximación mucho más sensible y específica que otras metodologías utilizadas para la detección de infiltración del SNC por células tumorales, sobre todo cuando el estudio se realiza en muestras estabilizadas<sup>279-281</sup>. Con estos antecedentes, planteamos como tercer objetivo de este trabajo doctoral, conocer la incidencia de infiltración oculta del SNC al diagnóstico en pacientes con NCDPB, y evaluar el posible efecto beneficioso de la administración de tratamiento intratecal profiláctico en los mismos. Hay que tener en cuenta que el tratamiento intratecal ha demostrado ser una estrategia terapéutica fundamental en otras leucemias agresivas con tendencia a afectar el SNC, como es el caso de la LLA, en la que la inclusión de una profilaxis sistemática de la infiltración neuromeningea en los protocolos de tratamiento ha supuesto una disminución drástica de las recaídas neuromeningeas<sup>227,254</sup>. En el caso de la NCDPB, a pesar de tener una tasa de recaída en SNC similar a la de la LLA ( $\approx 30\%$ )<sup>227</sup>, no se había evaluado previamente de forma prospectiva si, al igual que en la LLA, el tratamiento profiláctico del SNC condiciona un claro descenso en la tasa de recaídas neuromeningeas, y por ende, una supervivencia más prolongada. Este constituye el motivo por el cual planteamos también su estudio dentro del tercer objetivo del trabajo.

## **1. Patrón de diferenciación normal de la célula dendrítica plasmocitoide de médula ósea de adultos sanos.**

En este trabajo doctoral identificamos y caracterizamos por primera vez los diferentes estadios madurativos de los precursores de CDp (pre-CDp) de médula ósea de adultos sanos. En este sentido, demostramos que los precursores más inmaduros de CDp se localizan dentro del compartimento de células progenitoras hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> que expresan niveles elevados de CD123, de acuerdo con hallazgos previos en

MO humana fetal<sup>55</sup>; además, en nuestro trabajo comprobamos que a medida que estos precursores progresan en su diferenciación a CDp, se incrementa la intensidad de expresión de CD45, mientras que se observan variaciones mínimas en los niveles de expresión (elevada) de moléculas HLA de clase II (HLA-DR<sup>++</sup>). Precisamente, en función del patrón de expresión de estas cuatro proteínas de membrana (CD34, HLA-DR, CD123 y CD45) identificamos de forma sistemática en todas las MO normales analizadas, tres subpoblaciones de pre-CDp con características de células progresivamente más maduras: estadio I, CD34<sup>++</sup> HLA-DR<sup>++/+++</sup> CD123<sup>++</sup> CD45<sup>+</sup>; estadio II, CD34<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+/++</sup> CD123<sup>++/+++</sup> CD45<sup>+/++</sup>, y; estadio III, CD34<sup>neg</sup> HLA-DR<sup>++</sup> CD123<sup>++/+++</sup> CD45<sup>++</sup>. El hallazgo de que buena parte de los pre-CDp más inmaduros (estadio I) expresaba moléculas asociadas a CDp (p. ej. CD304<sup>neg/+</sup>) en ausencia de otros marcadores específicos de línea (p. ej. MPO<sup>neg</sup> y lisozima<sup>neg</sup>), unido además al hecho de que mostraran otras diferencias fenotípicas evidentes con los precursores CD34<sup>+</sup> de otras líneas hematopoyéticas (p. ej. mayor expresión de CD85j y CD304)<sup>112,128</sup>, apoyan su pertenencia a la línea de CDp. No obstante, dado que parte de las células de este estadio no expresan antígenos específicos de CDp, cabe la posibilidad de que exista cierto grado de "contaminación" con células progenitoras hematopoyéticas comprometidas a otras líneas.

Como cabía esperar, además de expresar CD34, los pre-CDp más inmaduros presentaban también positividad para otras moléculas típicas de los progenitores hematopoyéticos; entre estas se incluían los receptores de citocinas CD116, CD117 (c-kit) y CD126, que desaparecían en estadios posteriores. Además, los pre-CDp del estadio I mostraban algunos rasgos fenotípicos que en principio resultan más característicos de la CDc que de la CDp madura, incluyendo expresión de CD11c, CD13 y CD33<sup>16,138</sup> junto con moléculas típicas de la CDp, como CD123 de intensidad elevada y CD304<sup>68,112</sup>. La expresión de estos marcadores mieloides disminuía drásticamente en la maduración de estos precursores desde el estadio I al estadio II, con la salvedad de CD11c cuyos niveles siguieron aumentando en una parte de las células más diferenciadas. La expresión de marcadores mieloides por parte de la CDp es un hallazgo que se observa con relativa

frecuencia en su variante tumoral<sup>216,237</sup>. Clásicamente, este hallazgo se ha relacionado con la presencia de fenotipos aberrantes en la NCDPB, de forma similar a lo que ocurría con la expresión (aberrante) de CD13 y CD33 por parte de los blastos de pacientes con LLA<sup>282,283</sup>. La observación realizada por primera vez en nuestro estudio, de que los pre-CDp normales más tempranos también expresan marcadores mieloides que luego se pierden en los estadios más maduros, sugiere que, más que una aberración fenotípica, la expresión de CD13 y CD33 en las células tumorales de pacientes con NCDPB podría deberse al hecho de que la célula tumoral se encuentra en un estadio más indiferenciado.

Desde el punto de vista morfológico, los pre-CDp CD34<sup>+</sup> mostraban también características compatibles con una célula escasamente diferenciada y carecían de la morfología de célula dendrítica típica al ser colocada en cultivo en presencia de IL3; además, los pre-CDp del estadio I correspondían a células funcionalmente inmaduras. Así, eran incapaces de secretar IFN $\alpha$  tras estímulo *in vitro* con CpG-ODN, y no lograban inducir proliferación de células T alogénicas tras cultivo mixto. Teniendo en cuenta estas características, y según el modelo más reciente de ontogenia de la célula dendrítica humana propuesto por Lee et al.<sup>37</sup>, el estadio I de pre-CDp aquí descrito, podría corresponder al de un precursor común de célula dendrítica, o a un estadio tardío de este; posteriormente, esta célula podría salir de MO como precursor de CDc, o permanecer en ella para completar su diferenciación hasta CDp madura. No obstante, son necesarios nuevos estudios para confirmar la hipótesis de que el pre-CDp en estadio I pudiera ser también el precursor de la CDc periférica.

Desde el punto de vista fenotípico, llamaba la atención que en este primer estadio de maduración a CDp, los precursores CD34<sup>+</sup> expresaban marcadores típicos de célula dendrítica madura, tales como CLA y CD86, marcadores que se negativizaban en el siguiente estadio madurativo (estadio II). CLA es una glicoproteína de superficie asociada con el tropismo cutáneo y la capacidad de infiltrar la piel<sup>284</sup>. A este respecto, la expresión de CLA también se ha documentado en un porcentaje elevado de CDp neoplásicas, hecho que se ha relacionado con la particular propensión

que tiene esta neoplasia de infiltrar piel<sup>285</sup>. La expresión de CD86 en una parte de los pre-CDp de este estadio I, en ausencia de otras moléculas coestimuladoras y de señalización (p. ej. CD40<sup>neg</sup> y CD2<sup>neg</sup>), junto con la incapacidad de esta población celular de desencadenar una respuesta proliferativa T alogénica, apoyaría la hipótesis de que los pre-CDp del estadio I puedan tener un papel relevante en la inducción de tolerancia inmune<sup>286-288</sup>.

Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el que se desencadena la tolerancia inmunológica, se ha sugerido que la CDp (y/o sus precursores) podría inducir la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>neg</sup> a células T reguladoras CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, o inhibir la respuesta antígeno-específica de los linfocitos T ante la ausencia de coestimulación inflamatoria y/o la falta de expresión de CD40<sup>289</sup>. Ambas condiciones concurren en los pre-CDp de MO en el estadio I de maduración. No obstante, independientemente del tipo de respuesta inmunológica que desencadenen (inmunogénica vs. tolerogénica), la CDp debe ser capaz de captar y presentar antígenos. A este respecto, pudimos comprobar que los pre-CDp del estadio I tenían una capacidad de endocitosis de partículas exógenas (p. ej. dextrano-FITC) similar a la de la CDc de sangre periférica, y notablemente superior a la de los pre-CDp más maduros (estadios II y III). Además de su superioridad a la hora de capturar y endocitar antígenos, los pre-CDp en estadio I fueron los que mostraron niveles más elevados de expresión de moléculas HLA, siendo estas, elementos esenciales para la presentación antigénica a los linfocitos T<sup>290,291</sup>. El hecho de que esta capacidad de endocitosis de los pre-CDp I no vaya asociada con producción de IFN $\alpha$ , ni acabe desencadenando la proliferación de células T alogénicas, reforzaría el posible papel tolerogénico vs. inmunogénico del pre-CDp más inmaduro. En este sentido, cabe señalar que la posible función tolerogénica de los pre-CDp, fenotípicamente compatibles con los aquí referidos como estadio III de pre-CDp, se ha comprobado en el ámbito clínico en pacientes sometidos a trasplante alogénico de MO<sup>286,292</sup>. Dado que los pre-CDp en estadio I parecen estar mejor capacitados que los pre-CDp de estadio III para la captura y presentación de antígenos, sin desencadenar una respuesta T alogénica,



cabe plantear si estos pre-CDp más inmaduros podrían actuar como supresores de la respuesta proliferativa de los linfocitos T naïve y de memoria, de forma incluso más potente que los pre-CDp del estadio III. En tal caso, estos precursores podrían ser especialmente útiles en inmunoterapia, a la hora de mantener el equilibrio entre el efecto injerto contra huésped y la respuesta injerto contra leucemia, tras un trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos. Sin embargo, para poder confirmar esta hipótesis son necesarios experimentos funcionales adicionales a los que realizamos en nuestro estudio.

Los cambios fenotípicos que observamos en la progresión de los pre-CDp del estadio II al estadio III eran compatibles con un compromiso cada vez mayor a CDp, asociándose este paso a la pérdida de expresión de moléculas relacionadas con la célula progenitora hematopoyética y la línea mieloide, como ocurre en la diferenciación de otras poblaciones leucocitarias de MO<sup>293</sup>. Además, observamos un incremento progresivo de la expresión de marcadores típicos de célula dendrítica madura y de CPA. Así, cabe señalar que CD4 comenzó a expresarse (inicialmente de forma débil) en los pre-CDp del estadio II, siendo su expresión claramente evidente en el estadio III. Como hemos referido en la Introducción de este trabajo doctoral, uno de los criterios fenotípicos que se considera más relevante para el diagnóstico de la NCDPB es la expresión de CD4 junto con la positividad para CD56<sup>189,195</sup>. No obstante, la mayoría de los autores están de acuerdo al afirmar que la CDp normal no expresa CD56<sup>188</sup>, a diferencia de la célula tumoral de la NCDPB, observación que confirmamos también en este trabajo al demostrar la ausencia sistemática de expresión de CD56 en los tres estadios madurativos de pre-CDp presentes en MO normal. En contraposición con nuestras observaciones, recientemente se ha descrito la existencia de una subpoblación de CDp con fenotipo CD123++ CD4+ CD56+ en SP de sujetos sanos tras tratamiento con ligando de FLT3<sup>134</sup>, así como una (posible) población de CDs de MO y SP que expresaría CD56<sup>135,136</sup>. A pesar de esto, mientras no se confirme que esta población de CDp humanas constituye la contrapartida normal de la NCDPB, este marcador debe ser considerado como un marcador aberrante que puede ser utilizado para diferenciar la

CDp leucémica de la CDp normal residual, incluidos los pre-CDp. En lo que se refiere a CD4, su ausencia en el estadio más inmaduro de pre-CDp normales también apoyaría la existencia de neoplasias de CDp CD4<sup>neg</sup> ref.<sup>235</sup>, sin que ello implique una aberración fenotípica.

En consonancia con los cambios fenotípicos asociados a la maduración de CDp en MO normal anteriormente descritos, observamos que en los estadios II y III, los pre-CDp adquirirían de forma progresiva rasgos morfológicos y funcionales propios de células más diferenciadas, sobre todo al ser colocados en cultivo bajo condiciones óptimas de estimulación. Así, los pre-CDp más maduros de MO (estadio III) mostraban características fenotípicas, morfológicas y funcionales similares a las descritas para la CDp de SP<sup>16,128,188</sup>, con la salvedad de una menor secreción de IFN $\alpha$ . Estos hallazgos sugieren que estas células podrían representar el estadio terminal de diferenciación de la CDp dentro de la MO, y que estarían listas para abandonarla a través de la circulación sanguínea, con el fin de ejercer su función de centinelas del sistema inmune en los tejidos periféricos.

En resumen, en este primer apartado del presente trabajo doctoral demostramos por primera vez la existencia de tres estadios madurativos diferentes de pre-CDp en la MO de adultos sanos, que mostraban características fenotípicas, morfológicas, y funcionales distintas entre ellos. Llama la atención que la población más inmadura de pre-CDp (estadio I) coexpresaba marcadores asociados a CDp y marcadores mieloides habitualmente atribuidos a la CDc, además de rasgos fenotípicos asociados a la generación de tolerancia inmune. Asimismo, las características fenotípicas descritas para los diferentes estadios madurativos de los pre-CDp proporcionan un marco de referencia para la correcta identificación, caracterización e interpretación fenotípica de la célula tumoral de pacientes con NCDPB.

## **2. Clasificación de la NCDPB según el estadio madurativo de la célula dendrítica plasmocitoide tumoral: asociación con las características clínicas y biológicas de la enfermedad.**

Con el fin de determinar si la heterogeneidad clínica de la NCDPB está de algún modo relacionada con el estadio madurativo de la CDp tumoral, analizamos una serie relativamente amplia de 46 pacientes. En general, las características clínicas de nuestros pacientes eran superponibles a las de otras series de NCDPB descritas previamente<sup>190,192</sup>, excepto en lo que se refiere a la proporción de casos que presentaban infiltración cutánea al diagnóstico, que fue menor entre nuestros pacientes (64% vs. 76%-100%)<sup>190,192,211,220</sup>. Aunque no existe una explicación definitiva sobre las diferencias observadas en la incidencia de afectación cutánea entre nuestros casos y las series publicadas por otros autores, creemos que estas podrían ser debidas a que las lesiones cutáneas se han considerado hasta ahora como una de las principales características que apoyaría el diagnóstico de NCDPB, pudiendo así producirse un sesgo de selección al excluirse específicamente pacientes que no presentan lesiones en la piel, por considerarse en ellos poco probable el diagnóstico de NCDPB. Por otro lado, estas diferencias podrían ser debidas también a un sesgo en la selección de nuestros propios casos, si tenemos en cuenta que al Servicio de Citometría de la Universidad de Salamanca llegan casos complejos (de los que se remiten mayoritariamente muestras de SP y MO, y en menor medida de tejidos) referidos por otras instituciones, especialmente pacientes para los que se solicita una segunda opinión.

Una vez agrupados los casos de NCDPB de acuerdo con el estadio madurativo de la CDp tumoral, según las semejanzas encontradas entre su perfil fenotípico y las características observadas en los diferentes pre-CDp de MO normal, comprobamos que existían importantes diferencias entre los casos que presentaban células tumorales más inmaduras, respecto a aquellos cuyas CDp neoplásicas eran fenotípicamente más

diferenciadas; además, identificamos un tercer grupo de pacientes con características madurativas intermedias entre los dos primeros.

En términos generales, el grupo de pacientes con NCDPB que presentaba células tumorales más inmaduras fue el menos numeroso. Fenotípicamente, este grupo estaba integrado por pacientes cuyas células tumorales presentaban expresión de CD34, al menos parcial. Clásicamente, la expresión de CD34 se ha considerado un marcador de exclusión en el diagnóstico de las NCDPB<sup>189,217</sup>; no obstante, aunque poco frecuente, no es excepcional encontrar NCDPB con expresión -al menos parcial- de CD34 en los pre-CDp patológicos<sup>190,207,234</sup>. Curiosamente, en estas NCDPB CD34<sup>+</sup> se detectaba de forma sistemática una segunda población de blastos CD34<sup>+</sup>, diferente de las células de línea de CDp y que correspondía a una población celular mieloide fenotípicamente muy indiferenciada. Estos resultados están en consonancia con observaciones previas del grupo heleno para el estudio de las leucemias de células dendríticas, quienes describieron cuatro casos de NCDPB con características fenotípicas y clínicas similares a las que encontramos en nuestros pacientes con fenotipo más inmaduro<sup>190</sup>. Además, cabe señalar que entre estos casos CD34<sup>+</sup> se ha descrito también la presencia de blastos acompañantes de línea linfoide<sup>190</sup>.

La población de blastos CD34<sup>+</sup> acompañante puede llegar a constituir, en algunos casos, la más representada en MO. De hecho, al aplicar de forma estricta los criterios de la OMS de 2008<sup>157</sup> para el diagnóstico de leucemias agudas, muchos casos de NCDPB CD34<sup>+</sup> podrían ser clasificados como leucemias agudas de línea mieloide mínimamente diferenciadas o de linaje ambiguo, debido a la ausencia de marcadores de diferenciación, o a la expresión de marcadores mieloides/linfoides en la población mayoritaria de blastos no comprometidos a CDp, respectivamente. Desde el punto de vista genético y molecular, se ha demostrado que en los casos de NCDPB CD34<sup>+</sup>, tanto la población de blastos comprometida a CDp, como la mínimamente diferenciada, comparten las mismas aberraciones cromosómicas<sup>294,295</sup>, lo que sugiere que ambas poblaciones celulares surgen de una célula leucémica ancestral común, y que el componente de línea de CDp podría representar el compartimento de células

tumorales más diferenciado. Desde el punto de vista fenotípico, merece destacar que en estos casos CD34<sup>+</sup>, la población tumoral comprometida a CDp era frecuentemente CD56<sup>neg</sup> y NG2<sup>neg</sup><sup>190,294</sup>, al contrario de lo que ocurría con la mayoría de los casos de NCDPB con fenotipo más maduro (grupos 2 y 3). Además, el comportamiento clínico de los casos CD34<sup>+</sup> también era diferente del de los pacientes CD34<sup>neg</sup>. A modo de ejemplo, las NCDPB CD34<sup>+</sup> no solían presentar lesión cutánea, ni afectación extramedular al diagnóstico, siendo estos hallazgos por el contrario, frecuentes en los pacientes con células tumorales más diferenciadas (grupo 2 y sobre todo grupo 3 de NCDPB). Estos resultados indican que en las NCDPB CD34<sup>+</sup>, las células blásticas estarían confinadas preferentemente en la MO, y tendrían un comportamiento clínico similar al de una "leucemia aguda", asociado habitualmente a múltiples citopenias periféricas. Este comportamiento clínico de la enfermedad concuerda con el perfil inmunofenotípico inmaduro de las células tumorales de este grupo 1 de NCDPB, que apoya la hipótesis de que se trata de una neoplasia de células progenitoras, en la que las células neoplásicas muestran una capacidad limitada de diferenciación a estadios madurativos más avanzados de CDp.

Por el contrario, los pacientes clasificados dentro del grupo 3, y que por lo tanto mostraban un fenotipo de CDp tumoral más madura (NCDPB CD34<sup>neg</sup>/CD117<sup>neg</sup>), se caracterizaron por presentar con mayor frecuencia infiltración extramedular, sobre todo de la piel, y de afectación de los ganglios linfáticos y otros órganos linfoides secundarios, asemejándose su comportamiento clínico al de un linfoma agresivo<sup>296,297</sup>. En estos casos, la CDp tumoral se encontraría presumiblemente bloqueada en un estadio más maduro, similar al de una CDp normal que ya ha salido de la MO y que, a través de la SP y las vénulas del endotelio alto, ha migrado hacia tejidos periféricos y órganos linfoides secundarios, dando lugar a afectación extramedular. Estos hallazgos, unidos a la existencia de afectación medular, apoyan la hipótesis de que en la mayoría de los casos la NCDPB tiene su origen en un precursor de MO, que de forma secundaria infiltraría la piel<sup>208</sup> y otros órganos y tejidos periféricos.

Finalmente, los casos que presentaban un fenotipo intermedio (NCDPB CD34<sup>neg</sup>/CD117<sup>+</sup>) mostraron también un comportamiento clínico intermedio entre el observado en los otros dos grupos anteriores (inmaduro y maduro) de NCDPB.

Independientemente del subgrupo fenotípico de NCDPB y de las diferencias observadas en la forma de presentación clínica de la enfermedad, la evolución y el pronóstico de los pacientes diagnosticados de NCDPB fue sistemáticamente malo. En este sentido, merece destacar que debido a la presentación clínica de la enfermedad tan variada y en algunos casos ambigua, los pacientes recibieron diferentes tratamientos de inducción, cuya elección estuvo condicionada sobre todo por la forma de presentación del tumor. Así, mientras que algunos casos recibieron tratamiento de tipo LMA, en otros se administraron regímenes terapéuticos de tipo LLA, e incluso CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) o alguna de sus variantes. Al igual que lo referido previamente en otras series<sup>157,208</sup>, la tasa de remisiones completas alcanzada en nuestra serie fue elevada, independientemente del tratamiento administrado. No obstante, la mayoría de los casos presentó un comportamiento agresivo, con la aparición de recaídas tempranas, seguidas de una fase leucémica fulminante resistente al tratamiento y que terminó con la vida del paciente en un corto periodo de tiempo.

Un análisis más detallado de la evolución de los pacientes de acuerdo con el tipo de tratamiento recibido, puso de manifiesto que los casos tratados con protocolos de tipo LLA mostraban mejor evolución que el resto de pacientes, y en especial, que los pacientes tratados con regímenes de "tipo linfoma"; estos resultados corroboran observaciones previas de otros grupos<sup>192,208,211,248</sup>. No obstante, hay que tener en cuenta que la mayoría de los pacientes más jóvenes (niños) fueron tratados con protocolos de tipo LLA, y, por tanto, cabe la posibilidad de que el aparentemente mejor pronóstico de estos casos no sea estrictamente debido al tipo de tratamiento recibido, sino a la edad de los pacientes en el momento del diagnóstico. A este respecto, merece destacar que los dos únicos adultos que permanecieron vivos al cerrar este trabajo habían sido sometidos ambos a TAPH tras tratamiento de tipo LLA en un caso y de tipo LMA en el

otro. A pesar del pequeño número de casos incluidos en cada grupo, nuestros resultados refuerzan las observaciones previas de otros autores que sugieren que los pacientes con NCDPB tratados con protocolos de tipo LLA y/o sometidos a TAPH tendrían una supervivencia más larga<sup>189,190,211,215,248,249,260</sup>. El beneficio que supone para los pacientes con NCDPB recibir tratamiento con protocolos de tipo LLA podría estar relacionado con la administración sistemática de profilaxis del SNC, ya que en un elevado porcentaje de nuestros casos (60%) se detectó infiltración del SNC en el momento de la recaída, sobre todo entre los pacientes que no fueron tratados con protocolos de tipo LLA, ya que todos ellos excepto un caso, presentaban infiltración tumoral de LCR.

En resumen, en este apartado del trabajo de tesis doctoral mostramos que las CDp tumorales de la NCDPB muestran un perfil madurativo muy variable, que se traduce en un comportamiento clínico heterogéneo, que varía desde el comportamiento típico de una leucemia aguda al de un linfoma agresivo. Este amplio espectro clínico ha llevado a la administración de modalidades terapéuticas muy distintas. A pesar del pésimo pronóstico observado en la gran mayoría de los pacientes, la administración de tratamientos de tipo LLA con profilaxis del SNC y/o TAPH parecen ser, de todos los tratamientos administrados evaluados, los únicos potencialmente efectivos. En su conjunto, estos resultados confirman el comportamiento clínico heterogéneo y el pronóstico desfavorable de este subgrupo de neoplasias no linfoides, para las que sería necesario (re)definir de forma más precisa criterios diagnósticos y mejorar las estrategias terapéuticas, incorporando regímenes de tratamiento más eficientes y específicos (p. ej. nuevas moléculas<sup>261</sup> y/o regímenes más agresivos que incluyan profilaxis del SNC) con el fin de lograr remisiones completas más duraderas y medianas de supervivencia prolongadas. Además, en consonancia con observaciones previas<sup>189,190,192,220,221</sup>, nuestros resultados sugieren que en una proporción elevada de pacientes con NCDPB, la afectación del SNC podría estar presente ya al inicio de la enfermedad, pudiendo así contribuir a explicar el gran número de recaídas leptomeníngicas observado en estos pacientes. Ante esta posibilidad, nos planteamos como tercer objetivo de nuestro

estudio, determinar cuál es la incidencia de afectación del SNC al diagnóstico en estos pacientes, y el impacto del tratamiento intratecal en su evolución clínica.

### **3. Incidencia de infiltración del sistema nervioso central en NCDPB estudiadas al diagnóstico: impacto del tratamiento intratecal en el comportamiento clínico y pronóstico de la enfermedad.**

Al diagnóstico, los pacientes con NCDPB muestran tasas de infiltración del SNC relativamente altas ( $\approx 10\%$ )<sup>189-192,298</sup>, aunque generalmente, el diagnóstico de afectación neuromeníngea se ha realizado mediante técnicas relativamente poco sensibles -como la citología convencional de LCR y/o técnicas de imagen-, aplicadas únicamente a pacientes que presentan manifestaciones clínicas asociadas a afectación del SNC. Es decir, a los pacientes diagnosticados de NCDPB no se les evalúa de forma sistemática la posible existencia de infiltración del SNC por células tumorales, a menos que el paciente presente síntomas neurológicos evidentes. Además, estos pacientes tampoco reciben sistemáticamente tratamiento específico para tratar de erradicar la posible infiltración del SNC. Este hecho llama todavía más la atención si tenemos en cuenta que las recaídas en el SNC se refieren de forma recurrente en pacientes diagnosticados de NCDPB, con una frecuencia tres veces superior a la referida en el momento del diagnóstico ( $\approx 30\%$ )<sup>189,192</sup>. Dado que hoy se sabe que en las leucemias agudas y los linfomas agresivos, la recaída en SNC constituye una de las complicaciones más graves de la enfermedad, asociándose con una supervivencia significativamente más corta, además de ir habitualmente acompañada de recaída sistémica de la enfermedad<sup>299</sup>, cabría en principio esperar un comportamiento clínico similar para la NCDPB.

En general, el hecho de que no se evalúe sistemáticamente al diagnóstico la posible existencia de infiltración neuromeníngea en pacientes con NCDPB, podría ser debido, entre otros motivos, a la baja incidencia de la enfermedad -y por lo tanto a la limitada experiencia que existe con estos pacientes- y a la inclusión de esta entidad



diagnóstica en la clasificación actual de la OMS dentro de las neoplasias mieloides<sup>157</sup>, al ser este un grupo de hemopatías malignas en el que la infiltración del SNC es relativamente poco frecuente ( $\approx 5\%$  de los pacientes)<sup>300</sup>, desaconsejando el análisis sistemático de LCR en ausencia de sintomatología neurológica. Asimismo, en muchos centros la detección de afectación leptomeníngea en LCR sigue estando basada en técnicas poco sensibles, como la citología convencional aplicada sobre muestras frescas (no estabilizadas) de LCR, sin que se utilicen estrategias metodológicas que han demostrado mayor sensibilidad y eficiencia en otros tipos de neoplasias hematológicas<sup>279-281</sup>.

En nuestro trabajo demostramos la existencia de CDp tumorales en LCR de más de la mitad de los pacientes con NCDPB estudiados al diagnóstico. Estos hallazgos confirman la elevada frecuencia de enfermedad neuromeníngea oculta en pacientes con NCDPB<sup>189-192,298</sup>, no solo en el momento de la recaída<sup>189,192</sup> sino ya desde el mismo momento del diagnóstico de la enfermedad. Algunos autores han sugerido que el tropismo de algunos subtipos concretos de células tumorales por el SNC (por ej. de blastos mieloides de pacientes con LMA o de las células plasmáticas del mieloma) podría estar relacionado con la expresión de CD56<sup>301,302</sup>. Sin embargo, entre los pacientes con NCDPB estudiados en este trabajo, no encontramos asociación entre la expresión de CD56 y la presencia de células tumorales en LCR.

En nuestra serie, la administración de profilaxis o tratamiento intratecal ya en las etapas más tempranas del tratamiento sistémico, se tradujo en una mejor evolución clínica y una supervivencia significativamente más prolongada de los pacientes, frente a lo observado en aquellos casos que no recibieron tratamiento del SNC y que mostraron enfermedad leptomeníngea recurrente. Este hallazgo sugiere que los pacientes con NCDPB que tienen afectación oculta del SNC (CMF de alto rendimiento positiva con citología negativa, en ausencia de síntomas neurológicos) al diagnóstico podrían beneficiarse de la administración de terapia dirigida específicamente al SNC, sobre todo si esta se administra de forma temprana, inmediatamente tras el diagnóstico de la enfermedad.

La elevada frecuencia de afectación del SNC que encontramos en la serie de pacientes con NCDPB en la que realizamos este estudio sugiere que el SNC podría constituir un santuario de células tumorales -al menos en pacientes con NCDPB de presentación leucémica-, debido a la incapacidad para atravesar la barrera hematoencefálica de la mayoría de los fármacos citostáticos<sup>303</sup>. Además, este reservorio de células tumorales podría contribuir también a la recaída sistémica.

Como hemos referido anteriormente, la supervivencia prolongada observada en aquellos pacientes con NCDPB tratados con regímenes de tipo LLA, podría ser debida a que este tipo de protocolos incluye la administración de profilaxis del SNC. A su vez, el mejor pronóstico de los pacientes sometidos a TAPH<sup>248,260</sup>, independientemente de la administración o no de tratamiento intratecal, podría explicarse por las dosis elevadas de los fármacos administrados y/o el efecto antileucémico beneficioso de las células alogénicas del donante<sup>304</sup>, capaces de recircular en el organismo de forma sistémica y de atravesar incluso la barrera hematoencefálica<sup>305</sup>. Desgraciadamente, el TAPH no está exento de recaídas ( $\approx 1/3$  de los pacientes)<sup>248,260</sup> y tampoco es capaz de revertir el mal pronóstico de la enfermedad, si este procedimiento terapéutico no se aplica en la primera remisión completa<sup>260</sup>; además, en el TAPH la mortalidad por toxicidad del procedimiento sigue siendo relativamente alta<sup>306</sup>. Todo ello, unido a que muchos de los pacientes diagnosticados de NCDPB son a adultos mayores de 65 años<sup>157,189,209</sup> en los que habitualmente la realización de un TAPH está contraindicada, hace que el trasplante sea una opción subóptima. Por el contrario, el tratamiento intratecal en el contexto de una quimioterapia sistémica que no induce un efecto mieloablativo irreversible, constituye una opción terapéutica relativamente bien tolerada, convirtiéndose así en una alternativa ideal para el tratamiento de primera línea de pacientes que, aunque no sean candidatos a recibir un trasplante alogénico, presentan un estado general que permite la indicación de quimioterapia intensiva con fines curativos.

Respecto al tratamiento de los pacientes con NCDPB, cabe señalar también que en nuestro estudio no pudimos establecer una comparación entre el nuevo tratamiento

con el fármaco SL-401, dirigido al receptor de IL3 $\alpha$  (CD123), y la administración de profilaxis intratecal en el contexto de un régimen de tipo LLA. Esto es debido a que los pacientes que presentan afectación del SNC son excluidos del ensayo con SL-401 (NCT02113982); además, en la información disponible sobre los resultados de este ensayo clínico con SL-401, no se detallan las localizaciones donde se han producido las recaídas y/o progresión de la enfermedad tras la administración de SL-401<sup>261,268</sup>. Aun así, la posibilidad de evaluar en el futuro los posibles efectos beneficiosos de la administración intratecal de SL-401 sería de gran interés, sobre todo en pacientes que presentan una recaída neuromeningea de la enfermedad.

En resumen, en este trabajo referimos por primera vez la existencia de una elevada frecuencia de infiltración oculta del SNC al diagnóstico en pacientes con NCDPB; además, demostramos el posible beneficio de la administración de terapias dirigidas específicamente al SNC para revertir el pronóstico nefasto de la NCDPB. En este sentido, nuestros datos apoyan la incorporación sistemática del tratamiento del SNC, incluso en la forma de profilaxis, aun cuando no se identifiquen CDp tumorales en el LCR. Nuestros resultados también sugieren de forma indirecta que la infiltración oculta del SNC podría contribuir a explicar la elevada frecuencia de recaídas (p. ej. en SNC) observada en estos pacientes, a pesar de la elevada tasa de remisiones completas que presentan. No obstante, estos resultados deben ser confirmados en estudios prospectivos en series más amplias de pacientes estudiados desde el momento del diagnóstico.



# Conclusiones



**En relación con el primer objetivo, centrado en la identificación de los precursores de CDp en médula ósea de adultos sanos y el análisis de sus características morfológicas, fenotípicas y funcionales:**

1. En la MO de adultos sanos se identifican al menos tres estadios madurativos diferentes de CDp, que muestran distintas características morfológicas, fenotípicas y funcionales.
2. Los precursores de CDp más inmaduros (CD34<sup>+</sup>) coexpresan niveles variables de marcadores asociados a CDp, junto a marcadores mieloides habitualmente relacionados con la CDc, lo que sugiere que podría tratarse de un precursor común a ambas subpoblaciones de CDs, con características fenotípicas asociadas con la generación de tolerancia inmune.
3. El perfil inmunofenotípico de maduración normal de la CDp de MO definido de forma detallada en este trabajo, proporciona un modelo de referencia para el diagnóstico y clasificación de pacientes con neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica.

**En relación con el segundo objetivo, que perseguía establecer una asociación entre el estadio madurativo de la célula tumoral de pacientes con NCDPB y las características clínico-biológicas y evolutivas de la enfermedad:**

4. La CDp tumoral de la NCDPB muestra un perfil fenotípico heterogéneo, que permite subclasificar la enfermedad en tres subgrupos madurativos distintos: un grupo menos numeroso de NCDPB inmaduras, que expresa CD34<sup>+</sup> al menos de forma parcial, un grupo intermedio CD34<sup>neg</sup> CD117<sup>+</sup>, y un tercer grupo en el que las células tumorales muestran un fenotipo de CDp relativamente madura CD34<sup>neg</sup> y CD117<sup>neg</sup>.

5. El grado de diferenciación de la CDp neoplásica está relacionado con la forma de presentación clínica de la enfermedad. Así, mientras que las NCDPB más inmaduras se asemejan en su comportamiento a una leucemia aguda con citopenias periféricas y escasa frecuencia de afectación extramedular, las NCDPB más maduras habitualmente muestran afectación de órganos linfoides secundarios y de tejidos periféricos, especialmente de la piel.
6. Los protocolos terapéuticos asociados al tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda que incluyen profilaxis del SNC y/o el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos, parecen resultar las aproximaciones más eficaces para el tratamiento de la NCDPB, al ser los únicos capaces de lograr remisiones completas duraderas.

**En relación con la incidencia de infiltración del sistema nervioso central observada al diagnóstico en pacientes con NCDPB y el posible efecto beneficioso del tratamiento intratecal:**

7. Pese a la ausencia de sintomatología neurológica, los pacientes con NCDPB muestran una elevada frecuencia de infiltración del SNC al diagnóstico, especialmente en aquellos casos que debutan con formas leucémicas de la enfermedad, lo que sugiere que la CDp tumoral presenta un elevado tropismo por el SNC.
8. La administración temprana de tratamiento intratecal en pacientes con NCDPB se asocia con remisiones completas duraderas y una supervivencia más larga, lo que sugiere que el SNC podría actuar como un santuario para las CDp tumorales, de difícil acceso para los tratamientos sistémicos convencionales. De confirmarse en series más amplias de pacientes con un seguimiento prolongado, estos hallazgos apoyarían la incorporación sistemática de la profilaxis intratecal a los protocolos de tratamiento de NCDPB.



# Bibliografía



1. Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch.* 1868;325-337.
2. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973;137(5):1142-1162.
3. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J Exp Med.* 1974;139(6):1431-1445.
4. Mellman I, Nussenzweig M. Retrospective. Ralph M. Steinman (1943-2011). *Science.* 2011;334(6055):466.
5. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med.* 1974;139(2):380-397.
6. Steinman RM, Gutchinov B, Witmer MD, Nussenzweig MC. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J Exp Med.* 1983;157(2):613-627.
7. Levin D, Constant S, Pasqualini T, Flavell R, Bottomly K. Role of dendritic cells in the priming of CD4+ T lymphocytes to peptide antigen in vivo. *J Immunol.* 1993;151(12):6742-6750.
8. Palucka K, Banchereau J. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol.* 1999;19(1):12-25.
9. Stockwin LH, McGonagle D, Martin IG, Blair GE. Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunol Cell Biol.* 2000;78(2):91-102.
10. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:1-22.
11. Vu Manh TP, Bertho N, Hosmalin A, Schwartz-Cornil I, Dalod M. Investigating Evolutionary Conservation of Dendritic Cell Subset Identity and Functions. *Front Immunol.* 2015;6:260.
12. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood.* 1997;90(9):3245-3287.
13. O'Keeffe M, Mok WH, Radford KJ. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(22):4309-4325.
14. Pashenkov M, Huang YM, Kostulas V, Haglund M, Soderstrom M, Link H. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain.* 2001;124(Pt 3):480-492.
15. Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev.* 1997;156:25-37.
16. Almeida J, Bueno C, Alguero MC, et al. Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHC II+/lineage- cells. *Clin Exp Immunol.* 1999;118(3):392-401.
17. Breton G, Lee J, Liu K, Nussenzweig MC. Defining human dendritic cell progenitors by multiparametric flow cytometry. *Nat Protoc.* 2015;10(9):1407-1422.
18. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2000;165(11):6037-6046.
19. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol.* 2004;5(12):1219-1226.
20. Cohn L, Chatterjee B, Esselborn F, et al. Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3+ dendritic cells at cross presentation. *J Exp Med.* 2013;210(5):1049-1063.
21. Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, et al. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med.* 2010;207(6):1247-1260.
22. Klechevsky E. Human dendritic cells - stars in the skin. *Eur J Immunol.* 2013;43(12):3147-3155.
23. Aguzzi A, Barres BA, Bennett ML. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science.* 2013;339(6116):156-161.
24. Vandenabeele S, Hochrein H, Mavaddat N, Winkel K, Shortman K. Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations. *Blood.* 2001;97(6):1733-1741.
25. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 1989;74(7):2527-2534.
26. Wu W, Zhang X, Zhang C, Tang T, Ren W, Dai K. Expansion of CD14+CD16+ peripheral monocytes among patients with aseptic loosening. *Inflamm Res.* 2009;58(9):561-570.
27. von Bubnoff D, Scheler M, Hinz T, Matz H, Koch S, Bieber T. Comparative immunophenotyping of monocytes from symptomatic and asymptomatic atopic individuals. *Allergy.* 2004;59(9):933-939.
28. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood.* 1993;82(10):3170-3176.
29. Thieblemont N, Weiss L, Sadeghi HM, Estcourt C, Haeflner-Cavaillon N. CD14lowCD16high: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol.* 1995;25(12):3418-3424.
30. Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, et al. CD14+, CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46(10):2578-2586.
31. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep.* 2015;5:13886.

32. Petitprez V, Royer B, Desoutter J, et al. CD14+ CD16+ monocytes rather than CD14+ CD51/61+ monocytes are a potential cytological marker of circulating osteoclast precursors in multiple myeloma. A preliminary study. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(1):29-35.
33. Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, et al. The monocytic population in chronic lymphocytic leukemia shows altered composition and deregulation of genes involved in phagocytosis and inflammation. *Haematologica*. 2013;98(7):1115-1123.
34. Feng AL, Zhu JK, Sun JT, et al. CD16+ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. *Clin Exp Immunol*. 2011;164(1):57-65.
35. Seidler S, Zimmermann HW, Bartneck M, Trautwein C, Tacke F. Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. *BMC Immunol*. 2010;11:30.
36. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007;81(3):584-592.
37. Lee J, Breton G, Oliveira TY, et al. Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J Exp Med*. 2015;212(3):385-399.
38. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol*. 2010;11(7):585-593.
39. Ishikawa F, Niino H, Iino T, et al. The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. *Blood*. 2007;110(10):3591-3660.
40. McGovern N, Chan JK, Ginhoux F. Dendritic cells in humans—from fetus to adult. *Int Immunol*. 2015;27(2):65-72.
41. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012;10(2):120-136.
42. Durand M, Segura E. The known unknowns of the human dendritic cell network. *Front Immunol*. 2015;6:129.
43. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(3):151-161.
44. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med*. 1997;185(6):1101-1111.
45. Zuniga EI, McGovern DB, Pruneda-Paz JL, Teng C, Oldstone MB. Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. *Nat Immunol*. 2004;5(12):1227-1234.
46. Naik SH, Sathe P, Park HY, et al. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol*. 2007;8(11):1217-1226.
47. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656-661.
48. Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Jarrossay D, Manz MG. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol*. 2007;8(11):1207-1216.
49. Liu K, Victorica GD, Schwickert TA, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science*. 2009;324(5925):392-397.
50. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:563-604.
51. Liu K, Waskow C, Liu X, Yao K, Hoh J, Nussenzweig M. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat Immunol*. 2007;8(6):578-583.
52. Waskow C, Liu K, Darrasse-Jeze G, et al. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol*. 2008;9(6):676-683.
53. Haniffa M, Ginhoux F, Wang XN, et al. Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Med*. 2009;206(2):371-385.
54. Collin M, Bigley V, Haniffa M, Hambleton S. Human dendritic cell deficiency: the missing ID? *Nat Rev Immunol*. 2011;11(9):575-583.
55. Olweus J, BitMansour A, Warnke R, et al. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(23):12551-12556.
56. Olweus J, Lund-Johansen F; Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, N.J. Identification of a CD34+ bone marrow precursor for dendritic cells in blood and lymphoid tissues. United States patent 6,008,004. 1999.
57. Kärrićh JJ, Jachimowski LC, Uittenbogaart CH, Blom B. The plasmacytoid dendritic cell as the Swiss army knife of the immune system: molecular regulation of its multifaceted functions. *J Immunol*. 2014;193(12):5772-5778.
58. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*. 2007;10(12):1538-1543.
59. Ginhoux F, Merad M. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunol Cell Biol*. 2010;88(4):387-392.

60. Chorro L, Sarde A, Li M, et al. Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med*. 2009;206(13):3089-3100.
61. Foster CA, Holbrook KA, Farr AG. Ontogeny of Langerhans cells in human embryonic and fetal skin: expression of HLA-DR and OKT-6 determinants. *J Invest Dermatol*. 1986;86(3):240-243.
62. Dzopalic T, Rajkovic I, Dragicevic A, Colic M. The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. *Immunol Res*. 2012;52(1-2):20-33.
63. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-252.
64. Rafiq K, Bergtold A, Clynes R. Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity. *J Clin Invest*. 2002;110(1):71-79.
65. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha $\beta$ 5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*. 1998;188(7):1359-1368.
66. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8 $^{+}$  T cell tolerance. *J Exp Med*. 2002;196(12):1627-1638.
67. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(1):123-128.
68. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisrak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:163-183.
69. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408(6813):740-745.
70. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(16):9237-9242.
71. Thery C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(1):45-51.
72. Tel J, Schreiber G, Sittig SP, et al. Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8 $^{+}$  T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. *Blood*. 2013;121(3):459-467.
73. Sabatte J, Maggini J, Nahmod K, et al. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007;18(1-2):5-17.
74. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med*. 1999;5(8):919-923.
75. Chow A, Toomre D, Garrett W, Mellman I. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature*. 2002;418(6901):988-994.
76. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002;296(5566):301-305.
77. Skoberne M, Beignon AS, Bhardwaj N. Danger signals: a time and space continuum. *Trends Mol Med*. 2004;10(6):251-257.
78. Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N. Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol*. 2005;25(2):87-98.
79. Lechmann M, Berchtold S, Hauber J, Steinkasserer A. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol*. 2002;23(6):273-275.
80. de Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, et al. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity*. 1998;9(3):325-336.
81. Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS*. 2003;111(7-8):675-697.
82. Austyn JM. New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med*. 1996;183(4):1287-1292.
83. Granucci F, Foti M, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell biology. *Adv Immunol*. 2005;88:193-233.
84. Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:47-64.
85. Blake N, Haigh T, Shaka'a G, Croom-Carter D, Rickinson A. The importance of exogenous antigen in priming the human CD8 $^{+}$  T cell response: lessons from the EBV nuclear antigen EBNA1. *J Immunol*. 2000;165(12):7078-7087.
86. Kurts C, Heath WR, Carbone FR, Allison J, Miller JF, Kosaka H. Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med*. 1996;184(3):923-930.
87. Pulendran B, Palucka K, Banchereau J. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science*. 2001;293(5528):253-256.
88. Gett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J. T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol*. 2003;4(4):355-360.
89. Lanzavecchia A, Sallusto F. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(3):291-298.
90. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(12):984-993.
91. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:271-296.
92. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685-711.

93. Martin-Gayo E, Sierra-Filardi E, Corbi AL, Toribio ML. Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood*. 2010;115(26):5366-5375.
94. Wu L, Shortman K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol*. 2005;17(4):304-312.
95. Reizis B, Colonna M, Trinchieri G, Barrat F, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: one-trick ponies or workhorses of the immune system? *Nat Rev Immunol*. 2011;11(8):558-565.
96. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2004;173(7):4433-4442.
97. Matta BM, Castellaneta A, Thomson AW. Tolerogenic plasmacytoid DC. *Eur J Immunol*. 2010;40(10):2667-2676.
98. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol*. 2010;108:111-165.
99. Osorio F, Fuentes C, Lopez MN, Salazar-Onfray F, Gonzalez FE. Role of Dendritic Cells in the Induction of Lymphocyte Tolerance. *Front Immunol*. 2015;6:535.
100. Hubert P, Jacobs N, Caberg JH, Boniver J, Delvenne P. The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil? *J Leukoc Biol*. 2007;82(4):781-794.
101. Harimoto H, Shimizu M, Nakagawa Y, et al. Inactivation of tumor-specific CD8(+) CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells. *Immunol Cell Biol*. 2013;91(9):545-555.
102. Sisirak V, Faget J, Gobert M, et al. Impaired IFN- $\alpha$  production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer Res*. 2012;72(20):5188-5197.
103. Steinman RM. Dendritic cells and immune-based therapies. *Exp Hematol*. 1996;24(8):859-862.
104. Ochando JC, Homma C, Yang Y, et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol*. 2006;7(6):652-662.
105. Stary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T, Stingl G. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*. 2007;204(6):1441-1451.
106. Kool M, van Nimwegen M, Willart MA, et al. An anti-inflammatory role for plasmacytoid dendritic cells in allergic airway inflammation. *J Immunol*. 2009;183(2):1074-1082.
107. Lennert K, Remmele W. [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes]. *Acta Haematol*. 1958;19(2):99-113.
108. Feller AC, Lennert K, Stein H, Bruhn HD, Wuthe HH. Immunohistology and aetiology of histiocytic necrotizing lymphadenitis. Report of three instructive cases. *Histopathology*. 1983;7(6):825-839.
109. Facchetti F, de Wolf-Peeters C, Mason DY, Pulford K, van den Oord JJ, Desmet VJ. Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am J Pathol*. 1988;133(1):15-21.
110. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 1999;284(5421):1835-1837.
111. Cao W. Molecular characterization of human plasmacytoid dendritic cells. *J Clin Immunol*. 2009;29(3):257-264.
112. Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, et al. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol*. 2002;63(12):1133-1148.
113. Kuwabara H, Nagai M, Nishio H, et al. Co-expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, neuropilin-1, in a B cell lymphoma cell line (OHK) with primary effusion lymphoma immunophenotype. *Pathol Int*. 2003;53(9):649-651.
114. Bruder D, Probst-Keppler M, Westendorf AM, et al. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2004;34(3):623-630.
115. Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon  $\alpha/\beta$  induction. *J Exp Med*. 2001;194(12):1823-1834.
116. Bao M, Liu YJ. Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Protein Cell*. 2013;4(1):40-52.
117. Bao M, Hanabuchi S, Facchinetti V, et al. CD2AP/SHIP1 complex positively regulates plasmacytoid dendritic cell receptor signaling by inhibiting the E3 ubiquitin ligase Cbl. *J Immunol*. 2012;189(2):786-792.
118. Cabezon R, Sintès J, Llinas L, Benítez-Ribas D. Analysis of HLA9 mAbs on plasmacytoid dendritic cells. *Immunol Lett*. 2011;134(2):167-173.
119. Cao W, Rosen DB, Ito T, et al. Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J Exp Med*. 2006;203(6):1399-1405.
120. Schroeder JT, Bieneman AP, Xiao H, et al. TLR9- and FcepsilonRI-mediated responses oppose one another in plasmacytoid dendritic cells by down-regulating receptor expression. *J Immunol*. 2005;175(9):5724-5731.
121. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*. 2001;194(6):863-869.
122. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*. 2002;3(2):196-200.

123. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(15):5598-5603.
124. Guiducci C, Ott G, Chan JH, et al. Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J Exp Med*. 2006;203(8):1999-2008.
125. Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, et al. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2003;170(9):4465-4474.
126. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol*. 2006;7(1):49-56.
127. Pelka K, Shibata T, Miyake K, Latz E. Nucleic acid-sensing TLRs and autoimmunity: novel insights from structural and cell biology. *Immunol Rev*. 2016;269(1):60-75.
128. MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionic A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*. 2002;100(13):4512-4520.
129. Mathan TS, Figdor CG, Buschow SI. Human plasmacytoid dendritic cells: from molecules to intercellular communication network. *Front Immunol*. 2013;4:372.
130. Comeau MR, Van der Vurst de Vries AR, Maliszewski CR, Galibert L. CD123bright plasmacytoid predendritic cells: progenitors undergoing cell fate conversion? *J Immunol*. 2002;169(1):75-83.
131. Wu N, Veillette A. SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Curr Opin Immunol*. 2015;38:45-51.
132. Penna G, Sozzani S, Adorini L. Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2001;167(4):1862-1866.
133. Schmid MA, Takizawa H, Baumjohann DR, Saito Y, Manz MG. Bone marrow dendritic cell progenitors sense pathogens via Toll-like receptors and subsequently migrate to inflamed lymph nodes. *Blood*. 2011;118(18):4829-4840.
134. Petrella T, Comeau MR, Maynadie M, et al. 'Agranular CD4+ CD56+ hematodermic neoplasm' (blastic NK-cell lymphoma) originates from a population of CD56+ precursor cells related to plasmacytoid monocytes. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(7):852-862.
135. Osaki Y, Yokohama A, Saito A, et al. Characterization of CD56+ dendritic-like cells: a normal counterpart of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm? *PLoS One*. 2013;8(11):e81722.
136. Yu H, Zhang P, Yin X, et al. Human BDCA2+CD123+CD56+ dendritic cells (DCs) related to blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm represent a unique myeloid DC subset. *Protein Cell*. 2015;6(4):297-306.
137. Matsui T, Connolly JE, Michnevitz M, et al. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J Immunol*. 2009;182(11):6815-6823.
138. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*. 2013;140(1):22-30.
139. Tel J, Smits EL, Anguille S, Joshi RN, Figdor CG, de Vries IJ. Human plasmacytoid dendritic cells are equipped with antigen-presenting and tumoricidal capacities. *Blood*. 2012;120(19):3936-3944.
140. Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, et al. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol*. 2001;2(12):1144-1150.
141. Björck P. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood*. 2001;98(13):3520-3526.
142. Asselin-Paturel C, Brizard G, Chemin K, et al. Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J Exp Med*. 2005;201(7):1157-1167.
143. Zhang Z, Wang FS. Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Immunol*. 2005;2(6):411-417.
144. Gilliet M, Lande R. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(4):401-407.
145. Jegalian AG, Facchetti F, Jaffe ES. Plasmacytoid dendritic cells: physiologic roles and pathologic states. *Adv Anat Pathol*. 2009;16(6):392-404.
146. Ito T, Kanzler H, Duramad O, Cao W, Liu YJ. Specialization, kinetics, and repertoire of type I interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells. *Blood*. 2006;107(6):2423-2431.
147. Kalb ML, Glaser A, Stary G, Koszik F, Stingl G. TRAIL(+) human plasmacytoid dendritic cells kill tumor cells in vitro: mechanisms of imiquimod- and IFN- $\alpha$ -mediated antitumor reactivity. *J Immunol*. 2012;188(4):1583-1591.
148. Chaperot L, Blum A, Manches O, et al. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2006;176(1):248-255.
149. Liu YJ. IPC: professional type I interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:275-306.
150. Colonna M, Krug A, Cella M. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(3):373-379.
151. Rothenfusser S, Tuma E, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Hum Immunol*. 2002;63(12):1111-1119.
152. Fonteneau JF, Kavanagh DG, Lirvall M, et al. Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood*. 2003;102(13):4448-4455.

153. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, et al. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood*. 2003;101(9):3520-3526.
154. Hugues S, Fetter L, Bonifaz L, Helft J, Amblard F, Amigorena S. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol*. 2004;5(12):1235-1242.
155. Montoya MC, Sancho D, Vicente-Manzanares M, Sanchez-Madrid F. Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev*. 2002;186:68-82.
156. Marafioti T, Paterson JC, Ballabio E, et al. Novel markers of normal and neoplastic human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2008;111(7):3778-3792.
157. Facchetti F, Jones M, Petrella T. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. In: Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al., ed. WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008:145-147.
158. Blasius AL, Cella M, Maldonado J, Takai T, Colonna M. Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood*. 2006;107(6):2474-2476.
159. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(8):471-485.
160. Cao W, Zhang L, Rosen DB, et al. BDCA2/Fc epsilon RI gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Biol*. 2007;5(10):e248.
161. Jahn PS, Zanker KS, Schmitz J, Dzionek A. BDCA-2 signaling inhibits TLR-9-agonist-induced plasmacytoid dendritic cell activation and antigen presentation. *Cell Immunol*. 2010;265(1):15-22.
162. Walter-Yohrling J, Cao X, Callahan M, et al. Identification of genes expressed in malignant cells that promote invasion. *Cancer Res*. 2003;63(24):8939-8947.
163. Swiecki M, Colonna M. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol Rev*. 2010;234(1):142-162.
164. Baechler EC, Battilwalla FM, Karypis G, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2610-2615.
165. Bennett L, Palucka AK, Arce E, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med*. 2003;197(6):711-723.
166. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(8):594-606.
167. Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest*. 2005;115(2):407-417.
168. Guiducci C, Gong M, Xu Z, et al. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature*. 2010;465(7300):937-941.
169. O'Brien M, Manches O, Bhardwaj N. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection. *Adv Exp Med Biol*. 2013;762:71-107.
170. Pellerin A, Otero K, Czerkowicz JM, et al. Anti-BDCA2 monoclonal antibody inhibits plasmacytoid dendritic cell activation through Fc-dependent and Fc-independent mechanisms. *EMBO Mol Med*. 2015;7(4):464-476.
171. Hanabuchi S, Ito T, Park WR, et al. Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol*. 2010;184(6):2999-3007.
172. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol*. 2011;12(9):870-878.
173. Ito T, Yang M, Wang YH, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med*. 2007;204(1):105-115.
174. Hadeiba H, Lahl K, Edalati A, et al. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity*. 2012;36(3):438-450.
175. Goubier A, Dubois B, Gheit H, et al. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity*. 2008;29(3):464-475.
176. Worbs T, Bode U, Yan S, et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med*. 2006;203(3):519-527.
177. Munn DH, Sharma MD, Hou D, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest*. 2004;114(2):280-290.
178. Lombardi VC, Khaiboullina SF, Rizvanov AA. Plasmacytoid dendritic cells, a role in neoplastic prevention and progression. *Eur J Clin Invest*. 2015;45 Suppl 1:1-8.
179. Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, et al. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2003;63(19):6478-6487.
180. Labidi-Galy SI, Treilleux I, Goddard-Leon S, et al. Plasmacytoid dendritic cells infiltrating ovarian cancer are associated with poor prognosis. *Oncoimmunology*. 2012;1(3):380-382.
181. Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(22):7466-7474.



182. Demoulin S, Herfs M, Delvenne P, Hubert P. Tumor microenvironment converts plasmacytoid dendritic cells into immunosuppressive/tolerogenic cells: insight into the molecular mechanisms. *J Leukoc Biol.* 2013;93(3):343-352.
183. Bekereditian-Ding I, Schafer M, Hartmann E, et al. Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha. *Immunology.* 2009;128(3):439-450.
184. Tran Janco JM, Lamichhane P, Karyampudi L, Knutson KL. Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *J Immunol.* 2015;194(7):2985-2991.
185. Tel J, Aarntzen EH, Baba T, et al. Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients. *Cancer Res.* 2013;73(3):1063-1075.
186. Charles J, Chaperot L, Salameire D, et al. Plasmacytoid dendritic cells and dermatological disorders: focus on their role in autoimmunity and cancer. *Eur J Dermatol.* 2010;20(1):16-23.
187. Naylor MF, Crowson N, Kuwahara R, et al. Treatment of lentigo maligna with topical imiquimod. *Br J Dermatol.* 2003;149 Suppl 66:66-70.
188. Bueno C, Almeida J, Lucio P, et al. Incidence and characteristics of CD4(+)/HLA DRhi dendritic cell malignancies. *Haematologica.* 2004;89(1):58-69.
189. Feuillard J, Jacob MC, Valensi F, et al. Clinical and biologic features of CD4(+)CD56(+) malignancies. *Blood.* 2002;99(5):1556-1563.
190. Tsagarakis NJ, Kentrou NA, Papadimitriou KA, et al. Acute lymphoplasmacytoid dendritic cell (DC2) leukemia: results from the Hellenic Dendritic Cell Leukemia Study Group. *Leuk Res.* 2010;34(4):438-446.
191. Hashikawa K, Niino D, Yasumoto S, et al. Clinicopathological features and prognostic significance of CXCL12 in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *J Am Acad Dermatol.* 2012;66(2):278-291.
192. Pagano L, Valentini CG, Pulsoni A, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with leukemic presentation: an Italian multicenter study. *Haematologica.* 2013;98(2):239-246.
193. Dalle S, Beylot-Barry M, Bagot M, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: is transplantation the treatment of choice? *Br J Dermatol.* 2010;162(1):74-79.
194. Reichard KK, Burks EJ, Foucar MK, et al. CD4(+) CD56(+) lineage-negative malignancies are rare tumors of plasmacytoid dendritic cells. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(10):1274-1283.
195. Chaperot L, Bendriss N, Manches O, et al. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 2001;97(10):3210-3217.
196. Jacob MC, Chaperot L, Mossuz P, et al. CD4+ CD56+ lineage negative malignancies: a new entity developed from malignant early plasmacytoid dendritic cells. *Haematologica.* 2003;88(8):941-955.
197. Sapienza MR, Fuligni F, Agostinelli C, et al. Molecular profiling of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm reveals a unique pattern and suggests selective sensitivity to NF-kB pathway inhibition. *Leukemia.* 2014;28(8):1606-1616.
198. Dijkman R, van Doorn R, Szuhai K, Willemze R, Vermeer MH, Tensen CP. Gene-expression profiling and array-based CGH classify CD4+CD56+ hematodermic neoplasm and cutaneous myelomonocytic leukemia as distinct disease entities. *Blood.* 2007;109(4):1720-1727.
199. Bendriss-Vermare N, Chaperot L, Peoc'h M, et al. In situ leukemic plasmacytoid dendritic cells pattern of chemokine receptors expression and in vitro migratory response. *Leukemia.* 2004;18(9):1491-1498.
200. Lucio P, Parreira A, Orfao A. CD123hi dendritic cell lymphoma: an unusual case of non-Hodgkin lymphoma. *Ann Intern Med.* 1999;131(7):549-550.
201. Savoia P, Fierro MT, Novelli M, et al. CD56-positive cutaneous lymphoma: a poorly recognized entity in the spectrum of primary cutaneous disease. *Br J Dermatol.* 1997;137(6):966-971.
202. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol.* 1999;17(12):3835-3849.
203. Falcao RP, Garcia AB, Marques MG, et al. Blastic CD4 NK cell leukemia/lymphoma: a distinct clinical entity. *Leuk Res.* 2002;26(9):803-807.
204. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood.* 2005;105(10):3768-3785.
205. Adachi M, Maeda K, Takekawa M, et al. High expression of CD56 (N-CAM) in a patient with cutaneous CD4-positive lymphoma. *Am J Hematol.* 1994;47(4):278-282.
206. Kazakov DV, Mentzel T, Burg G, Dummer R, Kempf W. Blastic natural killer-cell lymphoma of the skin associated with myelodysplastic syndrome or myelogenous leukaemia: a coincidence or more? *Br J Dermatol.* 2003;149(4):869-876.
207. Khoury JD, Medeiros LJ, Manning JT, Sulak LE, Bueso-Ramos C, Jones D. CD56(+) TdT(+) blastic natural killer cell tumor of the skin: a primitive systemic malignancy related to myelomonocytic leukemia. *Cancer.* 2002;94(9):2401-2408.
208. Petrella T, Bagot M, Willemze R, et al. Blastic NK-cell lymphomas (agranular CD4+CD56+ hematodermic neoplasms): a review. *Am J Clin Pathol.* 2005;123(5):662-675.
209. Herling M, Teitell MA, Shen RR, Medeiros LJ, Jones D. TCL1 expression in plasmacytoid dendritic cells (DC2s) and the related CD4+ CD56+ blastic tumors of skin. *Blood.* 2003;101(12):5007-5009.

210. Garnache-Ottou F, Feuillard J, Saas P. Plasmacytoid dendritic cell leukaemia/lymphoma: towards a well defined entity? *Br J Haematol*. 2007;136(4):539-548.
211. Jegalian AG, Buxbaum NP, Facchetti F, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm in children: diagnostic features and clinical implications. *Haematologica*. 2010;95(11):1873-1879.
212. Rossi JG, Felice MS, Bernasconi AR, et al. Acute leukemia of dendritic cell lineage in childhood: incidence, biological characteristics and outcome. *Leuk Lymphoma*. 2006;47(4):715-725.
213. Herling M, Jones D. CD4+/CD56+ hematodermic tumor: the features of an evolving entity and its relationship to dendritic cells. *Am J Clin Pathol*. 2007;127(5):687-700.
214. Riaz W, Zhang L, Horna P, Sokol L. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: update on molecular biology, diagnosis, and therapy. *Cancer Control*. 2014;21(4):279-289.
215. Kharfan-Dabaja MA, Lazarus HM, Nishihori T, Mahfouz RA, Hamadani M. Diagnostic and therapeutic advances in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: a focus on hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(7):1006-1012.
216. Alayed K, Patel KP, Konoplev S, et al. TET2 mutations, myelodysplastic features, and a distinct immunoprofile characterize blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm in the bone marrow. *Am J Hematol*. 2013;88(12):1055-1061.
217. Garnache-Ottou F, Feuillard J, Ferrand C, et al. Extended diagnostic criteria for plasmacytoid dendritic cell leukaemia. *Br J Haematol*. 2009;145(5):624-636.
218. Leroux D, Mugneret F, Callanan M, et al. CD4(+), CD56(+) DC2 acute leukemia is characterized by recurrent clonal chromosomal changes affecting 6 major targets: a study of 21 cases by the Groupe Français de Cytogenetique Hematologique. *Blood*. 2002;99(11):4154-4159.
219. Deotare U, Kim DD, Michelis FV, Lipton JH. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplants in Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm in first complete remission: an effective therapy for a rare disease. *Leuk Lymphoma*. 2015:1-3.
220. Julia F, Dalle S, Duru G, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms: clinico-immunohistochemical correlations in a series of 91 patients. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(5):673-680.
221. Julia F, Petrella T, Beylot-Barry M, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: clinical features in 90 patients. *Br J Dermatol*. 2013;169(3):579-586.
222. Cota C, Vale E, Viana I, et al. Cutaneous manifestations of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm-morphologic and phenotypic variability in a series of 33 patients. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(1):75-87.
223. Piccaluga PP, Paolini S, Sapienza MR, Pileri SA. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: is it time to redefine the standard of care? *Expert Rev Hematol*. 2012;5(4):353-355.
224. Rauh MJ, Rahman F, Good D, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with leukemic presentation, lacking cutaneous involvement: Case series and literature review. *Leuk Res*. 2012;36(1):81-86.
225. Shinoda K, Muraki T, Yano M, Yamada T, Takao A. Infant leukemia suggestive of natural killer cell precursor origin followed an unusual clinical course. *Acta Haematol*. 2000;104(4):202-206.
226. Eros N, Marschalko M, Balassa K, et al. Central nervous system involvement in CD4+/CD56+ hematodermic neoplasm: a report of two cases. *J Neurooncol*. 2010;97(2):301-304.
227. Gokbuget N, Hoelzer D. Meningeosis leukaemica in adult acute lymphoblastic leukaemia. *J Neurooncol*. 1998;38(2-3):167-180.
228. Boiocchi L, Lonardi S, Vermi W, Fisogni S, Facchetti F. BDCA-2 (CD303): a highly specific marker for normal and neoplastic plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2013;122(2):296-297.
229. Jaye DL, Geigerman CM, Herling M, Eastburn K, Waller EK, Jones D. Expression of the plasmacytoid dendritic cell marker BDCA-2 supports a spectrum of maturation among CD4+ CD56+ hematodermic neoplasms. *Mod Pathol*. 2006;19(12):1555-1562.
230. Solly F, Angelot F, Garand R, et al. CD304 is preferentially expressed on a subset of B-lineage acute lymphoblastic leukemia and represents a novel marker for minimal residual disease detection by flow cytometry. *Cytometry A*. 2012;81(1):17-24.
231. Meyerson HJ, Blidaru G, Edinger A, et al. NRP-1/CD304 expression in acute leukemia: a potential marker for minimal residual disease detection in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2012;137(1):39-50.
232. Schuch G, Machluf M, Bartsch G, Jr., et al. In vivo administration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its antagonist, soluble neuropilin-1, predicts a role of VEGF in the progression of acute myeloid leukemia in vivo. *Blood*. 2002;100(13):4622-4628.
233. Angelot-Delettre F, Biichle S, Ferrand C, et al. Intracytoplasmic detection of TCL1--but not ILT7-by flow cytometry is useful for blastic plasmacytoid dendritic cell leukemia diagnosis. *Cytometry A*. 2012;81(8):718-724.
234. Knudsen H, Gronbaek K, thor Straten P, et al. A case of lymphoblastoid natural killer (NK)-cell lymphoma: association with the NK-cell receptor complex CD94/NKG2 and TP53 intragenic deletion. *Br J Dermatol*. 2002;146(1):148-153.
235. Montes-Moreno S, Ramos-Medina R, Martinez-Lopez A, et al. SPIB, a novel immunohistochemical marker for human blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms: characterization of its expression in major hematolymphoid neoplasms. *Blood*. 2013;121(4):643-647.

236. Kawai K. CD56-negative blastic natural killer-cell lymphoma (agranular CD4(+)/CD56(+)) haematodermic neoplasm? *Br J Dermatol*. 2005;152(2):369-370.
237. Garnache-Ottou F, Chaperot L, Biichle S, et al. Expression of the myeloid-associated marker CD33 is not an exclusive factor for leukemic plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2005;105(3):1256-1264.
238. Stenzinger A, Endris V, Pfarr N, et al. Targeted ultra-deep sequencing reveals recurrent and mutually exclusive mutations of cancer genes in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Oncotarget*. 2014;5(15):6404-6413.
239. Petrella T, Facchetti F. Tumoral aspects of plasmacytoid dendritic cells: what do we know in 2009? *Autoimmunity*. 2010;43(3):210-214.
240. Lucioni M, Novara F, Fiandrino G, et al. Twenty-one cases of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: focus on biallelic locus 9p21.3 deletion. *Blood*. 2011;118(17):4591-4594.
241. Jardin F, Callanan M, Penther D, et al. Recurrent genomic aberrations combined with deletions of various tumour suppressor genes may deregulate the G1/S transition in CD4+CD56+ haematodermic neoplasms and contribute to the aggressiveness of the disease. *Leukemia*. 2009;23(4):698-707.
242. Bueno C, Montes R, Martin L, et al. NG2 antigen is expressed in CD34+ HPCs and plasmacytoid dendritic cell precursors: is NG2 expression in leukemia dependent on the target cell where leukemogenesis is triggered? *Leukemia*. 2008;22(8):1475-1478.
243. Menezes J, Acquadro F, Wiseman M, et al. Exome sequencing reveals novel and recurrent mutations with clinical impact in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Leukemia*. 2014;28(4):823-829.
244. Jardin F, Ruminy P, Parmentier F, et al. TET2 and TP53 mutations are frequently observed in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Br J Haematol*. 2011;153(3):413-416.
245. Kim SS, Stevenson KE, Yoda A, et al. Loss-Of-Function Mutations In The Splicing Factor ZRSR2 Are Common In Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm and Have Male Predominance. *Blood*. 2013;122(21):741-741.
246. Dunford A, Schumacher SE, Savova V, et al. Escape from X-Inactivation Tumor Suppressor (EXITS) Genes Are Associated with Excess Incidence of Cancer in Men. *Blood*. 2015;126(23):3665-3665.
247. Rampal R, Levine RL. Leveraging cancer genome information in hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 2013;31(15):1885-1892.
248. Roos-Weil D, Dietrich S, Boumendil A, et al. Stem cell transplantation can provide durable disease control in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: a retrospective study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2013;121(3):440-446.
249. Dietrich S, Andrusis M, Hegenbart U, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasia (BPDC) in elderly patients: results of a treatment algorithm employing allogeneic stem cell transplantation with moderately reduced conditioning intensity. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(8):1250-1254.
250. Deotare U, Yee KW, Le LW, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with leukemic presentation: 10-Color flow cytometry diagnosis and HyperCVAD therapy. *Am J Hematol*. 2016;91(3):283-286.
251. Kantarjian H, Thomas D, O'Brien S, et al. Long-term follow-up results of hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (Hyper-CVAD), a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2004;101(12):2788-2801.
252. Rowe JM, Buck G, Burnett AK, et al. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood*. 2005;106(12):3760-3767.
253. Jabbour E, Thomas D, Cortes J, Kantarjian HM, O'Brien S. Central nervous system prophylaxis in adults with acute lymphoblastic leukemia: current and emerging therapies. *Cancer*. 2010;116(10):2290-2300.
254. Pinkel D, Woo S. Prevention and treatment of meningeal leukemia in children. *Blood*. 1994;84(2):355-366.
255. Colocci N, Glantz M, Recht L. Prevention and treatment of central nervous system involvement by non-Hodgkin's lymphoma: a review of the literature. *Semin Neurol*. 2004;24(4):395-404.
256. Gokbuget N, Hartog CM, Bassan R, et al. Liposomal cytarabine is effective and tolerable in the treatment of central nervous system relapse of acute lymphoblastic leukemia and very aggressive lymphoma. *Haematologica*. 2011;96(2):238-244.
257. Smyth L, Browne PV, Conneally E, et al. Burkitt leukaemia/lymphoma: R-CODOX-M/R-IVAC remains gold standard treatment in BL. *Ir J Med Sci*. 2015.
258. Abramson JS, Hellmann M, Barnes JA, et al. Intravenous methotrexate as central nervous system (CNS) prophylaxis is associated with a low risk of CNS recurrence in high-risk patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer*. 2010;116(18):4283-4290.
259. Reimer P, Rudiger T, Kraemer D, et al. What is CD4+CD56+ malignancy and how should it be treated? *Bone Marrow Transplant*. 2003;32(7):637-646.
260. Aoki T, Suzuki R, Kuwatsuka Y, et al. Long-term survival following autologous and allogeneic stem cell transplantation for blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Blood*. 2015;125(23):3559-3562.
261. Frankel AE, Woo JH, Ahn C, et al. Activity of SL-401, a targeted therapy directed to interleukin-3 receptor, in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm patients. *Blood*. 2014;124(3):385-392.

262. Frankel AE, Ramage J, Kiser M, Alexander R, Kucera G, Miller MS. Characterization of diphtheria fusion proteins targeted to the human interleukin-3 receptor. *Protein Eng.* 2000;13(8):575-581.
263. Frankel AE, Rossi P, Kuzel TM, Foss F. Diphtheria fusion protein therapy of chemoresistant malignancies. *Curr Cancer Drug Targets.* 2002;2(1):19-36.
264. Kreitman RJ. Recombinant immunotoxins containing truncated bacterial toxins for the treatment of hematologic malignancies. *BioDrugs.* 2009;23(1):1-13.
265. Feuring-Buske M, Frankel AE, Alexander RL, Gerhard B, Hogge DE. A diphtheria toxin-interleukin 3 fusion protein is cytotoxic to primitive acute myeloid leukemia progenitors but spares normal progenitors. *Cancer Res.* 2002;62(6):1730-1736.
266. Testa U, Pelosi E, Frankel A. CD 123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies. *Biomark Res.* 2014;2(1):4.
267. Angelot-Delettre F, Roggy A, Frankel AE, et al. In vivo and in vitro sensitivity of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm to SL-401, an interleukin-3 receptor targeted biologic agent. *Haematologica.* 2015;100(2):223-230.
268. Sweet KL, Pemmaraju N, Lane AA, et al. Lead-in Stage Results of a Pivotal Trial of SL-401, an Interleukin-3 Receptor (IL-3R) Targeting Biologic, in Patients with Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm (BPDCN) or Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood.* 2015;126(23):3795-3795.
269. Stemline Therapeutics I. Stemline Therapeutics Announces SL-401 Receives EU Orphan Drug Designation for Treatment of BPDCN. <https://www.globenewswire.com>; 2015. *Globe Newswire*; 2015.
270. He SZ, Busfield S, Ritchie DS, et al. A Phase 1 study of the safety, pharmacokinetics and anti-leukemic activity of the anti-CD123 monoclonal antibody CSL360 in relapsed, refractory or high-risk acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(5):1406-1415.
271. Smith BD, Roboz GJ, Walter RB, et al. First-in Man, Phase 1 Study of CSL362 (Anti-IL3Ra / Anti-CD123 Monoclonal Antibody) in Patients with CD123+ Acute Myeloid Leukemia (AML) in CR at High Risk for Early Relapse. *Blood.* 2014;124(21):120-120.
272. Smith BD, Roberts AW, Roboz GJ, et al. Minimal Residual Disease (MRD) As Exploratory Endpoint in a Phase 1 Study of the Anti-CD123 Mab CSL362 Given As Post-Remission Therapy in Adult Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood.* 2015;126(23):3819-3819.
273. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(12):920-932.
274. Uckun FM, Gaynon PS, Sensel MG, et al. Clinical features and treatment outcome of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia according to the apparent maturational stage of T-lineage leukemic blasts: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol.* 1997;15(6):2214-2221.
275. Testa U, Riccioni R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2007;92(1):81-94.
276. Lucio P, Parreira A, van den Beemd MW, et al. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia.* 1999;13(3):419-427.
277. Ciudad J, Orfao A, Vidriales B, et al. Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. *Haematologica.* 1998;83(12):1069-1075.
278. De Waele M, Renmans W, Jochmans K, et al. Different expression of adhesion molecules on CD34+ cells in AML and B-lineage ALL and their normal bone marrow counterparts. *Eur J Haematol.* 1999;63(3):192-201.
279. Quijano S, Lopez A, Manuel Sancho J, et al. Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *J Clin Oncol.* 2009;27(9):1462-1469.
280. Bromberg JE, Breems DA, Kraan J, et al. CSF flow cytometry greatly improves diagnostic accuracy in CNS hematologic malignancies. *Neurology.* 2007;68(20):1674-1679.
281. Hegde U, Filie A, Little RF, et al. High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology. *Blood.* 2005;105(2):496-502.
282. Drexler HG, Thiel E, Ludwig WD. Review of the incidence and clinical relevance of myeloid antigen-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1991;5(8):637-645.
283. Preti HA, Huh YO, O'Brien SM, et al. Myeloid markers in adult acute lymphocytic leukemia. Correlations with patient and disease characteristics and with prognosis. *Cancer.* 1995;76(9):1564-1570.
284. Santamaria-Babi LF. CLA(+) T cells in cutaneous diseases. *Eur J Dermatol.* 2004;14(1):13-18.
285. Petrella T, Meijer CJ, Dalac S, et al. TCL1 and CLA expression in agranular CD4/CD56 hematodermic neoplasms (blastic NK-cell lymphomas) and leukemia cutis. *Am J Clin Pathol.* 2004;122(2):307-313.
286. Lonial S, Torre C, David E, Harris W, Arellano M, Waller EK. Regulation of alloimmune responses by dendritic cell subsets. *Exp Hematol.* 2008;36(10):1309-1317.
287. Abe M, Metes D, Thomson AW. Dendritic cells and regulation of alloimmune responses: relevance to outcome and therapy of organ transplantation. *Expert Rev Clin Immunol.* 2005;1(3):419-430.
288. Fugier-Vivier IJ, Rezzoug F, Huang Y, et al. Plasmacytoid precursor dendritic cells facilitate allogeneic hematopoietic stem cell engraftment. *J Exp Med.* 2005;201(3):373-383.

289. Martin E, O'Sullivan B, Low P, Thomas R. Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity*. 2003;18(1):155-167.
290. Young LJ, Wilson NS, Schnorrer P, et al. Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol*. 2008;9(11):1244-1252.
291. Di Pucchio T, Chatterjee B, Smed-Sorensen A, et al. Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat Immunol*. 2008;9(5):551-557.
292. Waller EK, Rosenthal H, Jones TW, et al. Larger numbers of CD4(bright) dendritic cells in donor bone marrow are associated with increased relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2001;97(10):2948-2956.
293. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004;60(1):1-13.
294. Vermi W, Facchetti F, Rosati S, et al. Nodal and extranodal tumor-forming accumulation of plasmacytoid monocytes/interferon-producing cells associated with myeloid disorders. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(5):585-595.
295. Mohty M, Jarrossay D, Lafage-Pochitaloff M, et al. Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment. *Blood*. 2001;98(13):3750-3756.
296. Stein H, Warnke RA, Chan WC, et al. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In: Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al., ed. WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008:233-237.
297. Leoncini L, Raphaël M, Stein H, Harris NL, Jaffe ES, Kluin PM. Burkitt Lymphoma. In: Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al., ed. WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008:262-264.
298. Pemmaraju N, Kantarjian HM, Cortes JE, et al. Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm (BPDCN): A Large Single-Center Experience: Analysis of Clinical and Molecular Characteristics and Patient Outcomes. *Blood*. 2015;126(23):3746-3746.
299. Thomas X, Le QH. Central nervous system involvement in adult acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*. 2008;13(5):293-302.
300. Rees JK, Gray RG, Swirsky D, Hayhoe FG. Principal results of the Medical Research Council's 8th acute myeloid leukaemia trial. *Lancet*. 1986;2(8518):1236-1241.
301. Byrd JC, Edenfield WJ, Shields DJ, Dawson NA. Extramedullary myeloid cell tumors in acute nonlymphocytic leukemia: a clinical review. *J Clin Oncol*. 1995;13(7):1800-1816.
302. Chang H, Brandwein J, Yi QL, Chun K, Patterson B, Brien B. Extramedullary infiltrates of AML are associated with CD56 expression, 11q23 abnormalities and inferior clinical outcome. *Leuk Res*. 2004;28(10):1007-1011.
303. Pistoia V, Raffaghello L. Disclosing the mysteries of the central nervous system sanctuary for acute lymphoblastic leukemia cells. *Leuk Res*. 2011;35(6):699-700.
304. Aoki J, Ishiyama K, Taniguchi S, et al. Outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia patients with central nervous system involvement. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(12):2029-2033.
305. Hartrampf S, Dudakov JA, Johnson LK, et al. The central nervous system is a target of acute graft versus host disease in mice. *Blood*. 2013;121(10):1906-1910.
306. Leclerc M, Peffault de Latour R, Michallet M, et al. Reduced Intensity Versus Myelo-Ablative Conditioning Regimen before Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm: A Retrospective Study of the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy (SFGM-TC). *Blood*. 2015;126(23):3208-3208.